

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

KARLA CRISTINNE MANCINI COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *Zika virus* DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL NO DESENVOLVIMENTO DAS PROLES DE
CAMUNDONGOS COM OU SEM INFECÇÃO PRÉVIA PELO *Dengue virus 1***

Alfenas/MG

2018

KARLA CRISTINNE MANCINI COSTA

**AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *Zika virus* DURANTE O
PERÍODO GESTACIONAL NO DESENVOLVIMENTO DAS PROLES DE
CAMUNDONGOS COM OU SEM INFECÇÃO PRÉVIA PELO *Dengue virus 1***

Defesa de Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal de Alfenas.

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas
Orientador (a): Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco

Coorientador: Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

Alfenas/MG

2018

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central – Campus Alfenas

Costa, Karla Cristinne Mancini.

Avaliação dos efeitos da infecção pelo Zika virus durante o período gestacional no desenvolvimento das proles de camundongos com ou sem infecção prévia pelo Dengue vírus 1 / Karla Cristinne Mancini Costa – Alfenas/MG, 2018.

104 f.: il. --

Orientadora: Laríssa Helena Lobo Torres Pacheco.
Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) –
Universidade Federal de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Infecções por Vírus RNA - Desenvolvimento. 2. Vírus do Dengue - 3. Comportamento Animal. 4. Fator Neurotrófico Derivado do Cérebro. I. Pacheco, Laríssa Helena Lobo Torres. II. Título.

CDD-615.50724

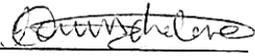
KARLA CRISTINNE MANCINI COSTA

AVALIAÇÃO DOS EFEITOS DA INFECÇÃO PELO *Zika virus* DURANTE O PERÍODO GESTACIONAL NO DESENVOLVIMENTO DAS PROLES DE CAMUNDONGOS COM OU SEM INFECÇÃO PRÉVIA PELO *Dengue virus 1*

A Banca examinadora, abaixo-assinada, aprova a Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade Federal de Alfenas.

Aprovada em: 22/02/2018

Profa. Dra. Larissa Helena Lobo Torres Pacheco
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Wesley Nogueira Brandão
Instituição: USP-SP

Assinatura: 

Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho a Deus!

O Seu amor cobre as minhas fraquezas e a
Sua fidelidade é maior do que todos os
obstáculos na minha vida!

Ao meu pai Oswaldo, por sempre confiar em mim e fazer dos meus sonhos, os seus. À minha mãe Helena, pelo amor, carinho e apoio. Aos meus irmãos, Paula e Kaio, por sempre me incentivarem a seguir em frente. Com todos vocês aprendi o verdadeiro significado de amor incondicional.

À minha família Alfenense, Lucilene, Gabriel, Guilherme, Léucio, Ivone e Afonso, pelo carinho e apoio durante todos os momentos.

Ao Gustavo,
que por inúmeras vezes me reergueu diante os obstáculos e me mostrou que sou capaz de vencer os desafios!

Obrigada pela cumplicidade, pelo amor, pela confiança, apoio e pelos bons momentos.

À Larissa,
que desde o início sempre confiou em minha capacidade. Obrigada pela oportunidade, pelo apoio incondicional, pela confiança, pelos desafios, pela compreensão e por toda dedicação em tornar possível a realização deste trabalho. Tenho em você um valioso exemplo de profissionalismo, ética e amor a profissão.

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho, pela importante coorientação, por todo suporte, apoio e contribuição na realização deste trabalho.

À Profa. Dra. Carla Speroni Ceron e a Profa. Dra. Marcia Helena Miranda Cardoso, pelo apoio e disponibilidade.

À Profa. Dra. Silvia Graciela Ruginsk Leitão, pela valiosa contribuição na execução deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Leonardo Augusto de Almeida, pelas ideias e disponibilidade.

À Marilene, pelo carinho, amizade e ajuda em tantos momentos.

Aos meus amigos do Laboratório de Farmacologia Experimental e Clínica, Luciana, Lucas, Jéssica, Núbia, Gabriel, Bruna e Carolina pelo companheirismo, pela ajuda e por todos os ótimos momentos e risadas compartilhados. Com vocês a caminhada foi mais leve.

Aos meus amigos do Laboratório de Vacinas, Gabriel, Stella, Pedro e Natália pela parceria, apoio e bons momentos.

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, Wesley e Ana Carolina, pela disponibilidade e por toda ajuda nos ensaios de RT-qPCR.

À Profa. Dra. Tania Marcourakis, pela colaboração ao disponibilizar os equipamentos para realização dos ensaios comportamentais.

À Lídia, pela paciência, carinho e disponibilidade.

À Profa Dra. Rosana Camarini, pela importante colaboração ao disponibilizar o *software* para análise dos ensaios comportamentais.

À Mayda e Giselda pelo carinho e auxílio em muitos momentos.

À UNIFAL/MG, que possibilitou o início da minha trajetória profissional.

À CAPES pelo apoio financeiro.

RESUMO

A infecção pelo *Zika virus* (ZIKV) é considerada um problema de saúde pública no Brasil. Contudo, pouco se sabe a respeito dos efeitos da infecção gestacional pelo ZIKV associada a uma infecção prévia pelo *Dengue virus 1* (DENV-1). Neste contexto, o objetivo deste trabalho foi avaliar se a presença de uma infecção prévia ao DENV-1 induz efeitos a médio e longo prazo (infância e adolescência) no desenvolvimento da prole de animais infectados durante o período gestacional com o ZIKV. Camundongos Swiss fêmeas adultas foram inoculadas com DENV-1 ou salina (0,9% NaCl) e, após a confirmação da infecção, submetidas ao acasalamento direcionado. Durante a gestação, as fêmeas foram submetidas à infecção com ZIKV ou salina. Foram realizados ensaios de ELISA para confirmação das infecções nas fêmeas-mães. Ainda, ensaios de RT-qPCR em amostras de tecido encefálico provenientes dos neonatos, foram efetuados para pesquisa de partículas virais de ZIKV. O desenvolvimento físico e reflexológico, atividade locomotora, ansiedade, acuidade visual e memória de referência espacial foram avaliados nas proles durante a infância (PN18, PN19 e PN20) e adolescência (PN40, PN41, PN42 e PN43). Ainda, foram quantificados os níveis de fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF) em diferentes estruturas encefálicas de filhotes em PN18. A detecção de anticorpos IgG anti-DENV-1 e anti-ZIKV nas fêmeas-mães, em diferentes momentos, demonstrou que as infecções realizadas foram bem-sucedidas. Foram obtidos resultados negativos para o teste de RT-qPCR para ZIKV em amostras de tecido encefálico dos camundongos neonatos. Proles de camundongos com infecção gestacional pelo ZIKV, associada à exposição prévia pelo DENV-1, demonstraram diminuição no ganho de peso e no comprimento, especialmente em fêmeas, em diferentes idades. Filhotes DENV/ZIKV apresentaram detecção precoce de parâmetros relacionados a descida dos testículos e perda da preensão palmar, bem como detecção tardia da orientação visual, em relação aos demais grupos avaliados. Ainda, proles DENV/ZIKV apresentaram alterações nos padrões comportamentais avaliados, dependendo da idade e do gênero, sendo observado comportamento de hipolocomoção, redução de ansiedade, diminuição da acuidade visual, quando comparados aos animais do grupo controle SALINA/SALINA, e melhora na aquisição de memória espacial quando

comparadas ao grupo SALINA/ZIKV. No estriado de filhotes DENV/ZIKV foi observado menor concentração de BDNF durante a infância comparado aos animais SALINA/SALINA e DENV/SALINA. Ainda, filhotes SALINA/ZIKV apresentaram redução nos níveis de BDNF no cerebelo e no estriado em relação aos animais SALINA/SALINA. Filhotes DENV/SALINA apresentaram uma diminuição nos níveis de BDNF no cerebelo quando comparados aos animais do grupo controle e, também mostraram um aumento nos níveis de BDNF no estriado quando comparados aos animais DENV/ZIKV. Nossos resultados sugerem que camundongos infectados pelo ZIKV, em um contexto de infecção prévia pelo DENV-1, apresentam prejuízo no desenvolvimento físico e reflexológico, bem como alterações comportamentais e bioquímicas dependentes da idade, mesmo com a ausência de ZIKV no tecido encefálico.

Palavras-chave: *Zika virus*. *Dengue virus 1*. Desenvolvimento. Comportamento. BDNF.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) infection is pointed as a public health problem in Brazil. However, there is still a lack of studies that evaluate the effects of gestational ZIKV infection associated to a prior *Dengue virus 1* (DENV-1) infection. Thus, the aim of the present study was to investigate the effects of previous DENV-1 infection in the development of mice infected with ZIKV during the gestational period. Female Swiss adult mice were inoculated with DENV-1 or saline (0,9% NaCl) and submitted to mating strategy after infection confirmation. During pregnancy, the females were infected with ZIKV or saline. ELISA assays were performed to confirm female infections. Furthermore, RT-qPCR assays in neonate mice brain were performed to investigate viral particles of ZIKV. The physical and reflexology development, locomotor activity, anxiety, visual acuity and spatial reference memory were evaluated by behavioral tests in the offspring during childhood (PN18, PN19 and PN20) and adolescence (PN40, PN41, PN42 and PN43). The levels of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) were quantified in different brain structures of pups in PN18. Detection of anti-DENV-1 and anti-ZIKV IgG antibodies in females, at different times, showed that the infections were successful. Negative results were obtained for the RT-qPCR assay for ZIKV in neonate mice brain. Our results showed that offspring with gestational infection by ZIKV, associated with prior DENV-1 infection, displayed a decrease in weight gain and length, especially in females, at different ages. DENV/ZIKV group presented early detection of testis descent, early loss of palmar grip and late detection of visual orientation when compared to the other groups. Also, DENV/ZIKV offsprings exhibited hipolocomotion, reduction of anxiety, decrease of visual acuity, when compared to the animals of control group SALINE/SALINE, and improvement in the acquisition of spatial memory when compared to the animals of SALINE/ZIKV group. There were observed a decrease in the BDNF levels in the striatum of DENV/ZIKV group compared to the SALINE/SALINE and DENV/SALINE groups during childhood. Still, SALINE/ZIKV pups showed a reduction in BDNF levels in the cerebellum and striatum when compared to SALINE/SALINE animals. DENV/SALINE pups presented a decrease in BDNF levels in the cerebellum compared to control animals and, also showed a BDNF increase in the striatum when compared to the DENV/ZIKV animals.

Our results suggest that mice with prior DENV-1 infection associated to gestacional ZIKV infection, present impairment in the physical and reflexological development, as well as behavioral and biochemical changes depending on the age, even with ZIKV absence in brain tissue.

Key words: *Zika virus*. *Dengue virus 1*. Development. Behavioral tests. BDNF.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Distribuição do DENV no Brasil	20
Figura 2 - Distribuição do ZIKV no Brasil	23
Figura 3 - Desenho experimental dos testes realizados	38
Figura 4 - Campo aberto utilizado	45
Figura 5 - Labirinto em cruz elevado utilizado	46
Figura 6 - Labirinto aquático de Morris (plataforma sinalizada) utilizado	47
Figura 7 - Esquema do labirinto aquático de Morris (memória espacial)	48
Figura 8 - ELISA detecção de anticorpos anti-DENV-1	52
Figura 9 - ELISA detecção de anticorpos anti-DENV-1 e anti-ZIKV	53
Figura 10 - Peso dos filhotes fêmeas durante o desenvolvimento	58
Figura 11 - Peso dos filhotes machos durante o desenvolvimento	59
Figura 12 - Comprimento dos filhotes fêmeas durante o desenvolvimento	60
Figura 13 - Comprimento dos filhotes machos durante o desenvolvimento	61
Figura 14 - Locomoção total em campo aberto	62
Figura 15 - Distância percorrida na área central do campo aberto	63
Figura 16 - Porcentagem de permanência nos braços abertos do LCE	64
Figura 17 - Frequência de <i>grooming</i> no LCE	65
Figura 18 - Tempo total de <i>grooming</i> no LCE	66
Figura 19 - Latência no labirinto aquático de Morris (plataforma visível)	67
Figura 20 - Treinamento – memória de referência espacial	69
Figura 21 - Teste – memória de referência espacial	71
Figura 22 - Quantificação de BDNF em estruturas encefálicas	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Desenvolvimento do SNC de camundongos e em humanos	26
Tabela 2 -	Parâmetros reprodutivos	54
Tabela 3 -	Parâmetros desenvolvimento físico das proles	56
Tabela 4 -	Parâmetros desenvolvimento reflexológico das proles	57

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	ARBOVIROSES E O VETOR <i>Aedes aegypti</i>	18
2.1	EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV E DO DENV NO BRASIL	19
2.1.1	<i>Dengue virus</i>	19
2.1.1.1	<i>Dengue virus</i> sorotipo 1	20
2.1.2	<i>Zika virus</i>	21
2.2	DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O ZIKV	24
2.2.1	Microcefalia	26
2.2.2	Alterações visuais	28
2.3	ANÁLISES COMPORTAMENTAIS	29
2.4	MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO ZIKV	31
3	OBJETIVOS	33
3.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	33
4	JUSTIFICATIVA	34
5	MATERIAIS E MÉTODOS	35
5.1	PRODUÇÃO E TITULAÇÃO VIRAL	35
5.2	DESENHO EXPERIMENTAL	35
5.2.1	Animais	35
5.2.2	Infecção prévia das fêmeas com DENV-1	36
5.2.3	Acasalamento e confirmação	36
5.2.4	Infecção gestacional como ZIKV	37
5.3	ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG ANTI-DENV-1 E ANTI-ZIKV NAS FÊMEAS-MÃES	38
5.4	RT-PCR: PESQUISA DE PARTÍCULAS VIRAIS DE ZIKV EM TECIDO ENCEFÁLICO DOS FILHOTES	40
5.5	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO	40
5.6	AVALIAÇÃO FÍSICA E REFLEXOLÓGICA DAS PROLES	41
5.6.1	Parâmetros físicos	41
5.6.2	Parâmetros reflexológicos	42
5.7	ENSAIOS COMPORTAMENTAIS	44
5.7.1	Campo aberto	44
5.7.2	Labirinto em cruz elevado	45
5.7.3	Labirinto aquático de Morris – plataforma visível	46
5.7.4	Labirinto aquático de Morris – memória de referência espacial...	47
5.8	QUANTIFICAÇÃO DE BDNF	49
5.9	ANÁLISES ESTATÍSTICAS	50
6	RESULTADOS	51

6.1	ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS E CONFIRMAÇÃO DAS INFECÇÕES NAS FÊMEAS-MÃES	51
6.2	RT-qPCR PARA QUANTIFICAÇÃO DE ZIKV EM TECIDO ENCEFÁLICO DE CAMUNDONGOS NEONATOS	53
6.3	AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO	54
6.4	AVALIAÇÃO FÍSICA E REFLEXOLÓGICA DAS PROLES	54
6.5	ENSAIO EM CAMPO ABERTO: ATIVIDADE LOCOMOTORA	61
6.6	ENSAIO EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE E PADRÃO DE GROOMING ASSOCIADO	63
6.7	ENSAIO EM LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (PLATAFORMA VISÍVEL): ACUIDADE VISUAL.	66
6.8	ENSAIO EM LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS: MEMÓRIA REFERÊNCIA ESPACIAL	68
6.9	QUANTIFICAÇÃO DE BDNF EM ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS.....	72
7	DISCUSSÃO	73
8	CONCLUSÕES	85
	REFERÊNCIAS	87
	ANEXOS	105

1 INTRODUÇÃO

O Brasil tem enfrentado uma epidemia de *Zika virus* (ZIKV) com mais de 120.000 casos confirmados até o momento (BRASIL, 2017a). O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, na floresta Zika na Uganda (DICK; HADDOW; KITCHEN, 1952). É um vírus de RNA de fita simples (com sentido positivo), que apresenta um genoma de 10,7 kb codificando apenas uma única poliproteína, sendo esta clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M, E) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (LINDENBACH, 2003). Análises filogenéticas utilizando genomas completos do ZIKV isolados no Brasil demonstram uma proximidade destas amostras com outros isolados de ZIKV da região sul-americana e países do Caribe (FARIA et al, 2016).

Classificado como um arbovírus membro da família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, o ZIKV é transmitido entre humanos por espécies de mosquitos *Aedes* sp., tais como *A. aegypti*, *A. albopictus*, e *A. africanus*. Nos seres humanos, a infecção por este vírus normalmente provoca uma reação leve e autolimitada conhecida como febre Zika, a qual é acompanhada por erupção maculopapular, dor de cabeça, conjuntivite e mialgia (IOOS et al, 2014).

O ZIKV foi detectado pela primeira vez no Brasil em maio de 2015 e os casos de microcefalia, associados à infecção pelo ZIKV, foram identificados a partir de novembro de 2015 (FARIA et al, 2016). Além da microcefalia, a infecção durante a gravidez também foi associada a outras anomalias congênitas (ECDC, 2015; PAHO/WHO, 2015). A detecção do ZIKV em tecido cerebral fetal e no fluido amniótico foi uma das primeiras evidências de que o vírus possui a capacidade de ser transmitido de mãe para filho (SCHULER-FACCINI et al, 2016; WHO, 2015; CALVET et al, 2016; BESNARD et al, 2014). Além disso, foi observado que o vírus é capaz de infectar células progenitoras neurais *in vitro* (TANG et al, 2016). De acordo com estudos estatísticos de Faria et al (2016), os casos de transmissão congênita do ZIKV incidem, principalmente, entre a 14^a a 17^a semana de gestação. Associadas ao ZIKV, novas complicações estão sendo identificadas, dentre as quais destacam-se as lesões oculares. As pesquisas são direcionadas para bebês com ou sem microcefalia (com perímetro cefálico normal) nascidos em área de alta incidência do vírus.

O *Dengue virus* (DENV) também é classificado como um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, o qual também mantém sua multiplicação e propagação na natureza por meio de mosquitos hematófagos do gênero *Aedes* sp., assim como o ZIKV (FIOCRUZ/IOC, 2017). As epidemias pelo DENV já são descritas desde os séculos XVIII e XIX, sendo que apenas em 1906 foi confirmada a transmissão deste vírus pelo mosquito *Aedes*. Este vírus apresenta quatro sorotipos distintos: DENV-1, DENV-2, DENV-3 e DENV-4, sendo que todos podem causar tanto a forma clássica quanto as formas graves da doença. Na segunda metade do século XX, o DENV emergiu como uma doença global, tendo sua difusão facilitada pela urbanização, pelo crescimento populacional e pelo aquecimento do planeta (KANTOR, 2016). A infecção gera imunidade duradoura contra o sorotipo específico e temporária aos outros três sorotipos. Uma segunda infecção por um sorotipo diferente do primeiro pode gerar um quadro grave da enfermidade (OPS, 2016). O DENV também é classificado como um vírus de RNA e provoca uma febre que pode ser incapacitante durante um período, sendo ainda caracterizada por extrema dor e rigidez das articulações, por isso também conhecida como febre "quebra-ossos". Outras manifestações mais graves desta infecção viral, como a dengue hemorrágica e a Síndrome do choque, podem ser fatais se não reconhecidas a tempo e se não forem tratadas adequadamente. Nas últimas décadas a prevalência desta doença tem crescido de forma significativa, sendo considerada endêmica em mais de 100 países (WHO, 2013).

Cabe ressaltar que nos últimos 20 anos o Brasil vem enfrentando várias epidemias recorrentes de DENV em muitos estados da federação. Nos últimos dois anos o cenário epidemiológico mudou e em 2015 já foi constatado a cocirculação do DENV e do ZIKV em quase todos os estados brasileiros (MARCONDES & XIMENES, 2015; MUSSO et al., 2015). Parte da população brasileira possui imunidade para um ou mais sorotipos de DENV, singularidade epidemiológica que induz muitos questionamentos que devem ser investigados pela comunidade científica, dentre os quais, a influência de uma imunidade prévia anti-DENV no curso da infecção. Neste contexto, o presente trabalho pretende determinar se a presença de uma imunidade prévia contra o DENV-1 pode influenciar o desfecho da infecção pelo ZIKV em modelo murino de infecção, com foco no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) da prole de mães infectadas previamente com DENV-1.

2 ARBOVIROSES E O VETOR *Aedes aegypti*

Conhecidos como arbovírus, os vírus transmitidos por artrópodes são alguns dos agentes etiológicos mais associados à doença febril humana, sendo considerados uma preocupação nas últimas décadas (FORSHEY et al, 2010). Os arbovírus apresentam grande capacidade de mutação e adaptação, o que os torna capaz de causar surtos epidêmicos. Estas infecções representam um problema de saúde significativo na América do Sul, especialmente em regiões tropicais, caracterizadas por altas temperaturas e umidade que favorecem a proliferação de mosquitos e, assim, a transmissão dos arbovírus (MOURÃO et al, 2015; FISCHER; STAPLES, 2014; FORSHEY et al, 2010; FISCHER; STAPLES, 2014).

Originário do Egito, o mosquito *Aedes aegypti* iniciou sua dispersão a partir da costa leste do continente africano para as Américas, por meio de embarcações que aportaram no Brasil para o tráfico de escravos. Os mosquitos fêmeas são caracterizados como hematófagos, ou seja, se alimentam de sangue. Se este vetor estiver infectado com algum vírus, no caso, DENV ou ZIKV, poderá transmitir o mesmo durante este processo de alimentação. Este mosquito apresenta uma peculiaridade: a discordância gonotrófica. Esta característica representa a capacidade do inseto em picar mais de uma pessoa para um mesmo lote de ovos produzido, sendo uma das justificativas para a grande propagação de uma doença por este vetor (FIOCRUZ/IOC, 2017).

No início do século 20, após ser identificado que o *A. aegypti* era transmissor da febre amarela urbana, medidas rígidas de controle foram executadas e, em 1955, o mosquito foi considerado como erradicado no Brasil. Porém, a erradicação não recobriu o continente americano em sua totalidade e o vetor permaneceu em algumas áreas como Venezuela, sul dos Estados Unidos, Guianas e Suriname, além da extensão insular (Caribe e Cuba). Há uma hipótese, avaliada como a mais provável, que explica essa reintrodução do mosquito no Brasil, a qual considera a denominada “dispersão passiva”, em que os deslocamentos humanos (marítimos e/ou terrestres) facilitaram essa dinâmica dispersiva, sendo necessário ressaltar a grande resistência dos ovos do vetor ao ressecamento. A diminuição e até mesmo a ausência de rigidez quanto às medidas de controle, após a ilusória erradicação do *A. aegypti*, permitiu a

reintrodução do vetor no Brasil no fim da década de 1960. Atualmente o mosquito é identificado em todos os estados brasileiros (FIOCRUZ/IOC, 2017).

2.1 EPIDEMIOLOGIA DO ZIKV E DO DENV NO BRASIL

A doença causada pelo DENV, bem como a causada pelo ZIKV, são morbidades de notificação compulsória, estando presentes na Lista Nacional de Notificação Compulsória de Doenças, Agravos e Eventos de Saúde Pública, sendo que a febre pelo ZIKV foi adicionada a essa lista apenas pela Portaria nº 204, de 17 de fevereiro de 2016, do Ministério da Saúde (BRASIL, 2017a).

2.1.1 *Dengue virus*

Existem, até a data de 24 de dezembro de 2016 (SE 51), 1.496.282 casos prováveis de dengue no Brasil, sendo uma incidência de 731,9 casos/100 mil hab. Durante este mesmo período, a região Sudeste obteve o maior número de casos prováveis registrados (857.013 casos; 57,3%) em relação ao total do país, sendo seguida pelas regiões Nordeste (324.299 casos; 21,7%), Centro-Oeste (202.875 casos; 13,6%), Sul (73.193 casos; 4,9%) e Norte (38.902 casos; 2,6%). As regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência para casos prováveis: 1.313,8 casos/100 mil hab. e 999,5 casos/100 mil hab., respectivamente. Entre os estados, Minas Gerais (2.529,5 casos/100 mil hab.), Goiás (1.830,7 casos/100 mil hab.), Rio Grande do Norte (1.673,9 casos/100 mil hab.) e Mato Grosso do Sul (1.682,5 casos/100 mil hab.) se destacam (BRASIL, 2017a).

Ainda, em 2016, 844 casos de dengue grave e 8.237 casos de dengue com sinais de alarme foram confirmados. O Sudeste foi caracterizado como a região com maior número de casos confirmados de dengue grave e de dengue com sinais de alarme, sendo registrados 439 e 3.785 casos, respectivamente. Destes, foram confirmados 629 óbitos, representando uma proporção de 6,9% dos casos graves ou

com sinais de alarme. Alagoas e Bahia obtiveram as maiores proporções de óbitos em relação ao total de casos de dengue grave ou com sinais de alarme, 31,8% e 27,8%, respectivamente (BRASIL, 2017a).

A Figura 1 apresenta a distribuição do DENV no território brasileiro em 2016.

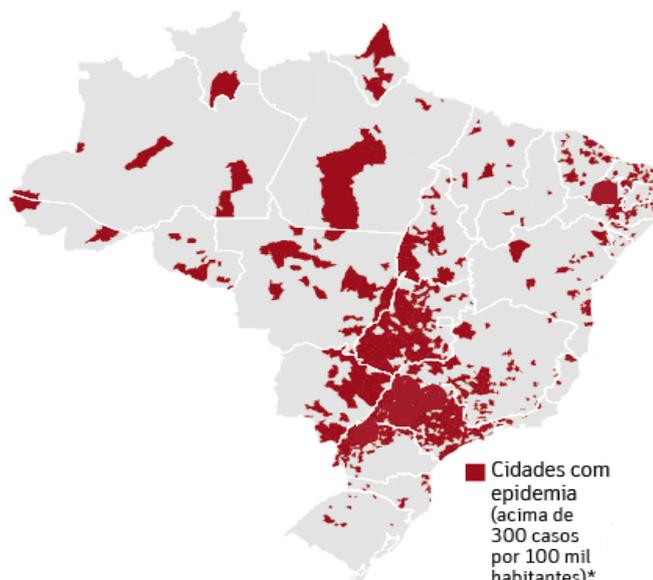


Figura 1 - Cidades com epidemia de DENV nos estados brasileiros em 2016 (300 casos/100 mil habitantes).

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE.

2.1.1.1 *Dengue virus* sorotipo 1

A dengue, uma das doenças virais mais comuns transmitidas por mosquitos aos humanos, apresenta quatro sorotipos, dentre os quais se destaca o DENV-1. Nas últimas décadas a prevalência desse vírus tem crescido de forma alarmante e, atualmente, está presente em mais de 100 países. Apesar da relevância para a saúde humana, pesquisas limitadas documentam a disseminação do DENV-1 no mundo (VILLABONA-ARENAS; ZANOTTO, 2013).

Introduzido no Brasil em 1981, o DENV-1 surgiu durante um surto na região Norte do país. Em 1986, o segundo foco importante da doença foi no Rio de Janeiro (região Sudeste), de onde se difundiu para as regiões Nordeste e Centro-Oeste do

país. Algum tempo depois, os sorotipos DENV-2, DENV-3 e DENV-4 foram identificados no Brasil (FIGUEIREDO, 2000). Dados referentes a estudos genéticos sobre o sorotipo DENV-1 demonstram que, com base na análise do gene E do envelope viral, existem cinco genótipos já relatados. Ainda, a partir de estudos filogenéticos das cepas de DENV-1 brasileiras e americanas foi definido que os isolados brasileiros de DENV-1 pertencem ao genótipo V, linhagem I, o que sugere a ocorrência de apenas um evento significativo de introdução de DENV-1 no Brasil (CARVALHO et al., 2010).

Estudos recentes relatam que diferentes linhagens de DENV-1 foram introduzidas no Brasil em momentos distintos e têm circulado em diferentes regiões do país. Essa introdução de novas cepas permitiu a ocorrência de eventos de recombinação genética desse vírus, resultando na substituição da linhagem e no aumento da diversidade genética do DENV-1 (DRUMOND et al., 2012).

2.1.2 Zika virus

Sabe-se que o ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947, na floresta Zika, na Uganda. O primeiro caso em humano foi identificado na Nigéria em 1954, sendo relatados também casos em outros países africanos, como Uganda, Tanzânia, Egito, República Centro Africana, Serra Leoa e Gabão e em partes da Ásia como Índia, Malásia, Filipinas, Tailândia, Vietnã e Indonésia (SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE MINAS GERAIS, 2015). Em 2007, ocorreu um surto de infecção pelo ZIKV na ilha Yap dos Estados Federados da Micronésia no Pacífico, sendo esta a primeira transmissão documentada fora da tradicional área endêmica na África e Ásia (TAPPE et al, 2013).

Na Europa, o primeiro caso confirmado laboratorialmente ocorreu no ano de 2013, em Hamburgo, em um alemão que havia viajado para a Tailândia (Lanciotti et al, 2007). Este fato foi seguido por uma epidemia com uma estimativa de 32.000 pacientes na Polinésia Francesa, entre o período de 2013-2014 (CAO-LORMEAU et al, 2014). Desde então, o vírus ampliou sua distribuição em vários países do Oceano

Pacífico e emergiu pela primeira vez nas Américas, na Ilha de Páscoa (Chile) em 2014 (TOGNARELLI et al, 2016).

Em 2015 foi confirmada a transmissão autóctone de febre pelo ZIKV no Brasil. Nos primeiros meses de 2016, foram notificados 91.387 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país (taxa de incidência de 44,7 casos/100 mil hab.), distribuídos em 1.359 municípios, dos quais 31.616 foram confirmados. A análise da taxa de incidência de casos prováveis, segundo regiões geográficas, demonstra que a região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência (113,4 casos/100 mil hab.). Entre as Unidades da Federação, destacam-se Mato Grosso (491,7 casos/100 mil hab.), Tocantins (190,9 casos/100 mil hab.), Bahia (164,8 casos/100 mil hab.) e Rio de Janeiro (156,7 casos/100 mil hab.). Em relação às gestantes, foram notificados 7.584 casos prováveis, sendo 2.844 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. Além disso, também foram confirmados três óbitos por ZIKV no país: um em São Luís/MA, um em Benevides/PA e outro em Serrinha/RN. A mediana de idade dos óbitos por febre pelo ZIKV foi de 20 anos (BRASIL, 2016a).

No final do mesmo ano (dezembro de 2016) novos dados foram divulgados, sendo que houve um crescimento substancial nos casos registrados (50ª Semana Epidemiológica –SE 50). Foram reportados 214.193 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país (taxa de incidência de 104,8 casos/100 mil hab.), distribuídos em 2.282 municípios, tendo sido confirmados 128.266 (59,9%) casos. Dentre as regiões afetadas, o Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência: 219,2 casos/100 mil hab. Já entre os estados, destacam-se Mato Grosso (670,5 casos/100 mil hab.), Rio de Janeiro (407,7 casos/100 mil hab.) e Bahia (338,5 casos/100 mil hab.) (BRASIL, 2017a).

Em relação à microcefalia associada à infecção viral pelo ZIKV, até 30 de abril de 2016 (SE 17) foram notificados 7.343 casos, segundo as definições do Protocolo de Vigilância (recém-nascido, natimorto, abortamento ou feto). Desses, 3.580 (48,8%) casos permanecem em investigação e 3.763 casos foram investigados e classificados, sendo 1.271 confirmados para microcefalia e/ou alteração do SNC sugestivos de infecção congênita pelo ZIKV e 2.492 descartados. Segundo a distribuição geográfica, todos os 7.343 casos notificados estão distribuídos em 1.376 (24,7%) dos 5.570 municípios brasileiros. Do total de casos notificados, 267 (3,6%) casos evoluíram para óbito fetal ou neonatal. Dos 267 óbitos fetais ou neonatais notificados, 178 (66,7%)

permanecem em investigação, 57 (21,3%) foram confirmados para microcefalia e/ou alteração do SNC sugestivos de infecção congênita e 32 (12%) foram descartados (BRASIL, 2016b). Novamente, os dados divulgados no final de 2016 mostram considerável aumento em relação ao início do ano, sendo notificados 10.867 casos. Desses, 7.684 (70,7%) casos foram investigados e classificados (2.366 confirmados, 49 prováveis e 5.269 descartados). Dentre os casos, 582 (5,3%) evoluíram para óbito fetal ou neonatal, dos quais 200 (34,4%) foram confirmados para infecção pelo ZIKV (BRASIL, 2017b).

Existem registros, até a data de 14 de dezembro de 2016, de circulação ativa do ZIKV nas Américas (em 50 países, estando o Brasil incluído na contagem), Oceania/Ilhas do Pacífico (Samoa Americana, Fiji, Kosrae, Estados Federados da Micronésia, Ilhas Marshall, Nova Caledônia, Papua-Nova Guiné, Samoa e Tonga), África (Cabo Verde) e Ásia (Singapura) (BRASIL, 2016e).

A Figura 2 apresenta a distribuição do ZIKV no território brasileiro em 2016.

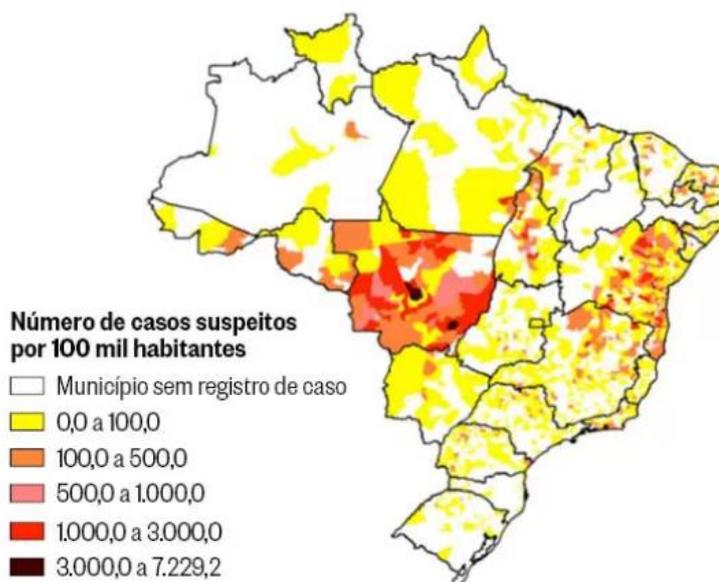


Figura 2 - Casos suspeitos de ZIKV nos estados brasileiros em 2016 (/100 mil habitantes).

Fonte: MINISTÉRIO DA SAÚDE.

2.2 DESENVOLVIMENTO DO SISTEMA NERVOSO CENTRAL E O ZIKV

O desenvolvimento é um processo contínuo, que se inicia na concepção e que se estende ao longo da vida. O desenvolvimento do sistema nervoso inicia-se com poucas células embrionárias, denominadas células-tronco neurais, e sofre, ainda no útero, um crescimento exponencial chegando a atingir centenas de bilhões de células a partir de sucessivas divisões mitóticas. Alguns processos relacionados ao desenvolvimento do SNC são finalizados durante o período gestacional, enquanto outros continuam durante anos após o nascimento (PINHEIRO, 2007).

Este processo normal de desenvolvimento neural é notoriamente distinto quando se compara roedores e humanos. O período gestacional dos camundongos equivale ao primeiro e ao segundo trimestre de gestação em humanos. Esse período caracteriza-se pela diferenciação e proliferação celular e início dos processos de gliogênese, sinaptogênese e mielinização (RICE & BARONE, 2000; BAYER et al., 1993; DWYER; BROIDE; LESLIE, 2008; DWYER; MCQUOWN; LESLIE, 2009; QUINN, 2005).

Durante esse período de desenvolvimento as conexões sinápticas serão remodeladas e refinadas por meio de diversos processos, entre os quais destaca-se a redução de células (apoptose). A viabilidade celular é um processo competitivo dependente da atividade neural, da transmissão sináptica e de fatores neurotróficos, como por exemplo, o fator neurotrófico derivado do encéfalo (BDNF). O BDNF desempenha funções importantes tanto na promoção do desenvolvimento adequado do SNC quanto na regulação da sobrevivência celular (TANG; MACHAALANI; WATERS, 2008). Ainda, está envolvido em outros processos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso, participando na plasticidade sináptica e em mecanismos de aprendizagem, como potencial de longa duração (LTP) e consolidação da memória (LANG et al., 2007; THOENEN, 1995).

O desenvolvimento do SNC sofre influências de fatores genéticos e ambientais, sendo considerado um período crítico até as primeiras semanas de vida pós-natal em roedores e os primeiros anos de vida em humanos. Durante esse período vulnerável, quaisquer perturbações na sequência de eventos normais causam efeitos irreversíveis

na estrutura e na função do tecido (MOURA-RIBEIRO; GONÇALVES, 2006; RICE; BARONE, 2000).

Sabe-se que a infecção pelo ZIKV é o exemplo mais recente de infecção congênita que afeta o desenvolvimento do SNC, no entanto, os efeitos desta infecção ainda não estão totalmente elucidados (PANCHAUD et al., 2016; FRANÇA et al., 2016). Estudos já verificaram a presença do vírus no tecido encefálico de fetos (MARTINES et al., 2016). Assim como ocorre em outras infecções congênitas, como a rubéola, as infecções por ZIKV são mais teratogênicas no primeiro trimestre gestacional e as complicações e alterações neurológicas ocorrem durante esse período. Casos clínicos associados a infecção intra-uterina pelo ZIKV estão associados não apenas a microcefalia, mas também a redução da espessura cortical encefálica, postura anormal de membros, cegueira e deficiência visual, além de disfunção auditiva (CALVET et al., 2016; MARTINES et al., 2016; LINDEN et al., 2016; LEAL et al., 2016; FRANÇA et al., 2016). A partir destes achados clínicos, uma nova denominação foi criada com o objetivo de caracterizar as consequências de uma infecção vertical por esse vírus: a Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (ALVARADO et al., 2017).

O desenvolvimento de regiões encefálicas específicas apresenta algumas especificidades. O presente trabalho avaliou a concentração de BDNF, um fator neurotrófico, no hipocampo, cerebelo e estriado, que são estruturas encefálicas com significativo desenvolvimento pós-natal em roedores. O hipocampo, localizado no telencéfalo, é uma das estruturas do sistema límbico, sendo caracterizado pelo envolvimento em funções importantes no encéfalo, tais como a aprendizagem e a memória. O desenvolvimento dessa estrutura encefálica se estende durante a vida pós-natal. Em roedores, durante o período embrionário compreendido entre 14°-19° dia gestacional, ocorre a proliferação de células piramidais nas regiões CA1 e CA3 do hipocampo. Entretanto, sua maturação prolonga-se até o período pós-natal, particularmente nas quatro primeiras semanas de vida do animal (BAYER, 1980; PICÓN, 2008).

Outra estrutura encefálica, o cerebelo, apresenta uma função importante no controle motor, sendo responsável também por algumas funções cognitivas, tais como atenção e linguagem. O desenvolvimento do córtex cerebelar, em seres humanos,

prolonga-se até o primeiro ano de vida, já em roedores essa fase ocorre durante os primeiros dias de vida pós-natal (8º e 24º dia) (DOBBING, 1982).

O estriado, estrutura formada pelo núcleo caudado e pelo putâmen, possui um papel importante em diversas atividades motoras, cognitivas e também em funções límbicas. O estriado de roedores apresenta o processo de neurogênese compreendido entre o 12º dia de gestação e os primeiros dias de vida pós-natal, principalmente no 14º e 15º dia gestacional. Entretanto, processos relacionados a sinaptogênese ocorrem no início do período pós-natal, entre PN3 e PN24 (CLANCY et al, 2013; EVANS et al, 2012; FENTRESS et al, 1981).

É importante destacar que mesmo que o curso temporal de desenvolvimento do SNC seja diferente entre humanos e roedores, é viável correlacionar estudos experimentais entre essas duas espécies (WORKMAN et al., 2013). A Tabela 1 mostra a comparação entre a diferença temporal no desenvolvimento de estruturas encefálicas entre camundongos e humanos.

Tabela 1 - Comparação entre o decurso temporal do desenvolvimento de estruturas encefálicas em camundongos e em humanos. PN: dia pós-natal.

	Desenvolvimento encefálico		Neurogênese	
	Camundongos	Humanos	Camundongos	Humanos
Hipocampo	PN15	3 meses	PN15	3 meses
	PN35	1 ano e 8 meses	PN35	1 ano e 8 meses
Cerebelo	PN15	3 meses	PN15	3 meses
	PN35	1 ano 8 meses	PN35	1 ano e 8 meses
Estriado	PN15	3 meses	PN15	3 meses
	PN35	1 ano 8 meses	PN35	1 ano e 8 meses

Fonte: WORKMAN et al., 2013

2.2.1 Microcefalia

A microcefalia é uma malformação congênita em que o encéfalo não se desenvolve adequadamente. É caracterizada por um perímetro encefálico inferior ao esperado (menor que 32 cm) para a idade e sexo e, dependendo da etiologia, pode

ser associada a malformações estruturais do encéfalo ou ser secundária a causas diversas (BRASIL, 2015).

Considerada uma situação inédita no mundo, com poucos registros na literatura médica, o ZIKV é uma causa em potencial para o nascimento de crianças com microcefalia (BRASIL, 2016c). No Brasil, dados do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (SINASC) indicam um aumento considerável na prevalência de microcefalia ao nascer, em 2015. Além disso, foram consolidadas evidências que corroboram o reconhecimento da relação entre a presença do ZIKV e o aumento da ocorrência de casos de microcefalia no país. De forma isolada, o quadro de microcefalia não implica, necessariamente, na presença de uma infecção pelo ZIKV e/ou na ocorrência de alterações motoras ou mentais. Crianças com perímetro encefálico abaixo da média podem ser cognitivamente normais, sobretudo se a microcefalia for de origem familiar. Porém, a maioria dos casos reportados segue acompanhada de alterações motoras e cognitivas, variando de acordo com o grau de acometimento cerebral. De um modo geral, essas crianças apresentam atraso no desenvolvimento neuropsicomotor e, em alguns casos, as funções sensitivas (audição e visão) também são comprometidas. O comprometimento cognitivo ocorre em cerca de 90% dos casos (BRASIL, 2015).

Levando em consideração o período em que se inicia, a microcefalia pode ser classificada em dois grupos: 1- microcefalia congênita (presente no nascimento, sendo alguma vezes chamada de "microcefalia primária", porém, como este termo se refere a um fenótipo particular de microcefalia, usa-se preferencialmente "microcefalia congênita") e 2- microcefalia pós-natal (refere-se à ausência de crescimento normal do perímetro cefálico após o nascimento, ou seja, o encéfalo é normal ao nascimento, por isso é também chamada de "microcefalia secundária") (BRASIL, 2015).

Especialistas do Instituto Nacional de Saúde da Mulher, da Criança e do Adolescente Fernandes Figueira (IFF/Fiocruz) afirmam que a microcefalia não apresenta uma única causa, sendo a infecção viral uma fonte causal substancial para essa alteração. O vírus da rubéola é um dos mais conhecidos e há evidências de que este vírus ultrapassa a placenta, acometendo o tecido cerebral de forma a desacelerar o crescimento dos neurônios e outras células. Essa alteração do crescimento encefálico culmina com uma alteração na taxa de crescimento ósseo, sendo que a

presença de calcificações indica que a infecção ocorreu provavelmente no período inicial da gestação (BRASIL, 2016c).

Aragão et al. (2016) avaliaram características clínicas e de neuroimagem de 23 crianças com diagnóstico de infecção congênita pelo ZIKV, presumindo que esta era a causa dos danos causados no SNC. Esta associação foi comprovada por Rasmussen et al. (2016), que utilizou os critérios de Shepard para confirmar a teratogenicidade induzida pelo ZIKV. Embora alguns estudos sugiram que os danos ao desenvolvimento do SNC ocorram em decorrência da infecção durante o primeiro e segundo trimestre de gestação, a associação temporal entre a infecção pelo ZIKV em diferentes períodos da gestação e os efeitos teratogênicos ainda não está clara.

2.2.2 Alterações visuais

Em 2016 foi relatado um aumento considerável no número de casos de microcefalia em mulheres grávidas, que apresentaram sintomas característicos da infecção pelo ZIKV. Os recém-nascidos, além de apresentarem desenvolvimento inadequado do encéfalo, também apresentaram algumas alterações oculares e, por esse motivo, surgiram estudos de correlação dessas alterações com a presença do vírus durante o período gestacional (MIRANDA et al, 2016). Entretanto, já foi relatado caso em que neonato sem alterações características de microcefalia apresentava achados compatíveis com alterações oculares resultantes de uma infecção pelo ZIKV durante o período gestacional (VENTURA et al, 2016).

Porém, é necessário ressaltar que doenças como rubéola, sífilis, AIDS, citomegalovírus e toxoplasmose também poderiam resultar em alterações visuais no feto e, assim, torna-se imprescindível identificar e excluir outros patógenos nas gestantes. Exames de retinografia revelaram que neonatos nascidos de mães infectadas pelo ZIKV no primeiro trimestre da gestação apresentavam alterações oculares como maculopatia pigmentada, atrofia coriorretiniana, micro córnea e anormalidades do nervo óptico, características diferentes dos neonatos cujas mães apresentavam uma síndrome viral no segundo trimestre de gestação. Estas alterações revelaram-se distintas das infecções apresentadas acima, o que confirmam a

ausência da interferência de outros patógenos nos casos relatados (MIRANDA et al, 2016).

2.3 ANÁLISES COMPORTAMENTAIS

O comportamento representa uma relação entre a fisiologia e o ambiente externo e, portanto, variações fisiológicas podem induzir comportamentos específicos e previsíveis (WEBER, 1997). Dessa forma, estudos neurocomportamentais podem representar ferramentas úteis na avaliação dos efeitos da infecção pelo ZIKV em uma fase crítica de desenvolvimento encefálico.

Caracterizado como uma ferramenta destinada à avaliação da atividade exploratória e locomotora de animais, o campo aberto permite ainda, a avaliação do medo. Este instrumento consiste, basicamente, em uma arena circular vazia, tornando-se um ambiente aversivo aos animais, que por sua vez tendem a permanecer mais tempo na periferia do que no centro desse campo. Este comportamento denomina-se tigmotaxia, em que roedores com medo não exploram a área central da arena (CRUZ et al, 1997). Existem estudos que utilizam o campo aberto para inferir o comportamento ansioso dos animais, uma vez que substâncias ansiolíticas revertem o comportamento tigmotático (MARTINS, 2009).

O labirinto em cruz elevado é um instrumento padronizado para avaliar ansiedade em animais. Para este teste, os animais apresentam uma tendência a permanecer mais tempo nos braços fechados, visto que ambientes abertos são naturalmente aversivos. Os indicadores de ansiedade mais comumente avaliados neste modelo são o número de entradas e o tempo gasto nos braços abertos em relação ao tempo total do teste. Fármacos ansiolíticos elevam o tempo de permanência nos braços abertos (PELLOW et al., 1985). O *grooming* dos roedores também pode ser utilizado como ferramenta para avaliar a ansiedade. O *grooming* é um comportamento característico de mamíferos, sendo definido como movimentos padronizados e estereotipados no sentido rostro-caudal e que está associado ao hábito de limpeza animal. Esse padrão comportamental é sensível a alterações em interações sociais, ambientais e farmacológicas (REEVES, 2016).

Para avaliar possíveis alterações visuais nos roedores uma das principais ferramentas é o labirinto aquático de Morris com uma plataforma visível. Este labirinto consiste em um tanque circular preenchido com água, contendo uma plataforma de acrílico submersa 1 cm abaixo do nível da água, em local pré-determinado, sendo esta plataforma sinalizada com um objeto, a fim de proporcionar sua visualização pelo animal. A água deve se tornar opaca pela adição de leite em pó, garantindo assim que o animal só se guiará pela visualização do objeto sobre a plataforma. Para este teste, utiliza-se como indicador o tempo gasto pelo animal para encontrar a plataforma sinalizada (período de latência) (GIMENES, 2008; SANTOS, 1999).

O processo de aprendizagem e memória espacial em roedores também pode ser avaliado pelo labirinto aquático de Morris (GIMENES, 2008; SANTOS, 1999). Para escapar da água, o animal deve encontrar a plataforma. Porém, a localização dessa plataforma deve ser realizada apenas com o auxílio de pistas distais distribuídas na sala de experimentação. A água deve se tornar opaca pela adição de leite em pó, a fim de garantir que o animal não veja a plataforma, impedindo que a mesma se torne uma pista proximal (SANTOS, 1999; VALADARES, 2006). Os animais têm a habilidade de aprender relações espaciais entre objetos e utilizar essas relações como ferramentas para se localizarem em um ambiente específico, de forma independente de sua própria localização (O'KEEFE; NADEL, 1978). Dessa forma, ao utilizar apenas pistas distais e considerando-se a necessidade de que conheça a relação angular entre essas pistas distintas, o animal é forçado a construir um mapa do ambiente (XAVIER; OLIVEIRA-FILHO; SANTOS, 1999).

Um dos princípios fundamentais inerentes à avaliação comportamental afirma que as propriedades funcionais do comportamento são determinadas pelas relações entre os estímulos e as respostas de um organismo (SKINNER, 1981). Nesse contexto, caracterizar as respostas comportamentais em modelos murinos, relacionadas as alterações no SNC induzidas pela infecção com ZIKV durante o período gestacional, frente uma infecção prévia ao DENV-1, poderá fornecer informações que auxiliem no preenchimento de lacunas ainda existentes quanto ao conhecimento do processo fisiopatológico associado a doença. Somente em 2015 o ZIKV foi considerado um problema pela Organização Mundial de Saúde (OMS), pois no Brasil foi observado uma forte associação deste vírus com casos de microcefalia e outras síndromes neurológicas. Embora alguns estudos sugiram que os danos ao

desenvolvimento do SNC ocorram em decorrência da infecção durante o primeiro e segundo trimestre de gestação, a associação temporal entre a infecção pelo ZIKV em diferentes períodos da gestação e os efeitos teratogênicos ainda não está clara (FARIA et al, 2016).

2.4 MODELOS EXPERIMENTAIS PARA ESTUDO DO ZIKV

A crescente necessidade em compreender mecanismos de disseminação, patogênese, bem como a resposta imunológica do hospedeiro frente a infecção pelo ZIKV estimularam a busca e o desenvolvimento de muitos modelos experimentais (MORRISON; DIAMOND, 2017). Fernandes et al. (2016) avaliaram a infecção pelo ZIKV em camundongos Swiss heterogênicos recém-nascidos utilizando duas vias distintas, intracerebral e subcutânea. Ambas as vias de infecção resultaram em manifestações neurológicas significativas, incluindo letargia, ataxia e paralisia nos camundongos neonatos, sendo que tais sinais foram identificados após seis dias da infecção no grupo infectado pela via intracerebral e após 12 dias no grupo infectado pela via subcutânea. As análises histopatológicas para o grupo infectado pela via intracerebral mostraram redução pronunciada no número de neurônios, principalmente no córtex encefálico. Além disso, foram observadas lesões no hipocampo, identificadas pela presença de infiltrados inflamatórios e morte neuronal. Já o grupo infectado pela via subcutânea apresentou redução mais discreta no número de neurônios no córtex, sendo que no hipocampo foram observadas algumas áreas hemorrágicas no neurópilo, áreas homogêneas do tecido nervoso existentes entre corpos celulares de neurônios, formadas por dendritos, axônios mielínicos e amielínicos, prolongamentos de astrócitos, oligodendrócitos e micróglia. Os camundongos infectados pela via subcutânea também apresentaram alterações pronunciadas na medula espinhal, observando-se principalmente, mielopatia leve a moderada caracterizada por degeneração neuronal em três dos quatro animais do grupo, além de astrócitos hipertróficos.

Mesmo que modelos experimentais de infecção pós-natal em roedores representem grande utilidade na avaliação do desenvolvimento do SNC, visto que o

terceiro trimestre do desenvolvimento fetal em humanos equivale as primeiras semanas do período pós-natal em roedores, os modelos de infecção gestacional pelo ZIKV também representam grande importância e valia na identificação de alterações patológicas na placenta e nos tecidos encefálicos dos fetos em desenvolvimento (SEMPLE et al., 2013; MYSOREKAR; DIAMOND, 2016; WALDORF et al., 2016). Desse modo, respostas patológicas e/ou implicações fetais identificadas nos diversos modelos experimentais ocorrem devido a diferença entre os animais e os protocolos adotados para cada experimento, sendo relevante considerar os diferentes objetivos estabelecidos pelos trabalhos.

Embora estudos iniciais com camundongos imunocompetentes adultos não tenham identificado processos patológicos oriundos da infecção pelo ZIKV frente inoculação pelas vias periféricas, ainda não existem pesquisas avaliando possíveis consequências no desenvolvimento do SNC, resultantes de uma infecção congênita pelo ZIKV em camundongos Swiss imunocompetentes (MORRISON; DIAMOND, 2017).

3 OBJETIVOS

Avaliar se a presença de uma infecção prévia ao DENV-1 (sorotipo 1) poderá induzir efeitos a médio e longo prazo (infância e adolescência) no desenvolvimento das proles de animais infectados pelo ZIKV durante o período gestacional.

3.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os valores de detecção de anticorpos anti-DENV-1 e anti-ZIKV, antes do acasalamento e após o período de desmame das proles, nos camundongos fêmeas infectadas previamente com DENV-1 e com ZIKV durante o período gestacional;
- b) Nas proles de camundongos infectados pelo ZIKV no período gestacional associada à infecção prévia pelo DENV-1, avaliar:
 - A presença e carga viral de ZIKV no encéfalo dos filhotes;
 - Os parâmetros físicos e reflexológicos entre PN5 e PN41;
 - A atividade locomotora, ansiedade, acuidade visual e memória espacial durante a infância e a adolescência;
 - A concentração de BDNF em diferentes estruturas encefálicas (cerebelo, estriado e hipocampo) durante infância.

4 JUSTIFICATIVA

Por muitos anos, o ZIKV ficou restrito à região equatorial da Ásia e África, não sendo considerado um problema público de saúde. Apenas em 2015 o ZIKV foi visto como um problema pela OMS, pois foi observada uma forte associação deste vírus com casos de microcefalia e outras síndromes neurológicas no Brasil. Embora alguns estudos sugiram que os danos ao desenvolvimento do SNC ocorram em decorrência da infecção durante o primeiro e segundo trimestre de gestação, a associação temporal entre a infecção pelo ZIKV em diferentes períodos da gestação e os efeitos teratogênicos ainda não está clara.

Outro fator intrigante, que diferencia o Brasil dos outros países, é a possibilidade da influência do cenário epidemiológico. É fato que o Brasil vem enfrentando várias epidemias recorrentes de dengue em muitos estados da federação nas últimas décadas, fazendo com que parte da população brasileira possua imunidade para um ou mais sorotipos da doença. Nos últimos dois anos, o cenário epidemiológico mudou e em 2016 já foi constatado a cocirculação do DENV e do ZIKV em quase todos os estados brasileiros. Vale ressaltar ainda que, apesar da introdução de outros sorotipos, o DENV-1 ainda é responsável por grande parte dos casos de dengue notificados no Brasil.

Apesar destes dados, pouco se sabe a respeito dos efeitos da infecção gestacional pelo ZIKV associada a uma infecção prévia pelo DENV-1 no desenvolvimento da prole. Neste contexto, o protocolo experimental deste estudo foi realizado durante o período gestacional de camundongos, uma vez que para o desenvolvimento do SNC, o período gestacional de roedores equivale ao primeiro e ao segundo trimestre de gestação em humanos. Espera-se que este estudo possa contribuir com a produção de aporte científico para melhor compreensão das consequências de uma infecção gestacional pelo ZIKV em indivíduos previamente infectados pelo DENV-1.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra de ZIKV utilizada neste trabalho foi isolada de um paciente sintomático do Ceará e gentilmente cedida pelo Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo. A amostra de DENV-1 utilizada refere-se à cepa Mochizuki, obtida do banco de microrganismos do Laboratório de Vacinas da Universidade Federal de Alfenas.

5.1 PRODUÇÃO E TITULAÇÃO VIRAL

As amostras de ZIKV e de DENV-1 foram inoculadas em células C6/36 e após desenvolvimento do efeito citopático, o sobrenadante foi coletado, clarificado por centrifugação e o título viral foi determinado por meio da contagem do número de unidades formadoras de placas (pfu), utilizando células BHK-21. O cálculo do título viral foi feito pelo número de placas virais detectadas multiplicado pelo inverso da diluição.

5.2 DESENHO EXPERIMENTAL

O presente estudo foi realizado de acordo com o desenho experimental descrito a seguir.

5.2.1 Animais

Foram utilizados camundongos Swiss, fêmeas e machos, com idade entre 5 a 6 semanas de vida, provenientes do Biotério Central da Universidade Federal de

Alfenas (UNIFAL-MG), para a obtenção das proles estipuladas neste protocolo. Os animais foram alojados em uma sala, contendo uma *rack* ventilada com mini-isoladores (gaiolas), com temperatura controlada ($20 \pm 3^{\circ}\text{C}$) e com ciclo de doze horas claro-escuro, sendo a luz acesa às 7:00 horas. Água e comida foram fornecidas *ad libitum* aos roedores durante todo procedimento experimental. Com o objetivo de fornecer um período de adaptação, os animais foram mantidos nestas condições por quatro dias antes do início do experimento.

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética Animal da Instituição, com número de protocolo: 22/2016 (ANEXO A).

5.2.2 Infecção prévia das fêmeas com DENV-1

Camundongos fêmeas, com idade aproximada de 6 semanas, foram submetidos a uma infecção com DENV-1 (1×10^5 pfu) ou SALINA (NaCl 0,9%), utilizando a veia caudal (intravenosa - IV) como via de administração, 14 dias antes do acasalamento. Após esse período, foi realizado a punção na veia caudal nesses mesmos animais, a fim de se obter amostras (soro) para confirmação da infecção (presença de anticorpos anti-DENV-1) pelo Ensaio da Imunoabsorção Enzimática (ELISA).

5.2.3 Acasalamento e diagnóstico de prenhez

Na etapa posterior, as fêmeas já imunizadas e em idade fértil, foram submetidas ao acasalamento direcionado. Inicialmente, foram efetuados esfregaços vaginais diariamente, com o objetivo de detectar o comportamento do ciclo estral das fêmeas. Durante a fase de proestro/estro, as fêmeas foram colocadas junto aos machos (na proporção 2 fêmeas para 1 macho) durante o início da fase escura do dia (às 19 horas). Na manhã seguinte, a confirmação do acasalamento foi realizada sempre no mesmo horário, durante o início do período claro do dia (às 7 horas da

manhã), pela presença do tampão vaginal (membrana branca opaca na entrada do canal vaginal) ou pelo resultado positivo do teste de esperma nas fêmeas (presença de espermatozoides no esfregaço vaginal, observado diretamente ao microscópio óptico), sendo este considerado o primeiro dia gestacional – (G1). As fêmeas prenhes foram então acondicionadas individualmente em mini-isoladores/moradias, onde permaneceram até o período de desmame da prole.

5.2.4 Infecção gestacional com ZIKV

Confirmada a gestação, as fêmeas prenhes, já acondicionadas individualmente, foram submetidas à infecção pelo ZIKV (1×10^5 pfu) ou SALINA (NaCl 0,9%), utilizando a veia caudal como via de administração (IV), na faixa compreendida entre G7-G10 da gestação. Assim, os seguintes tratamentos foram realizados:

- **Grupo SALINA/SALINA:** administração de salina (IV) nas mães 14 dias antes do acasalamento e em G7-G10;
- **Grupo SALINA/ZIKV:** administração de salina (IV) nas mães 14 dias antes do acasalamento e infecção com 1×10^5 pfu de ZIKV (IV) em G7-G10;
- **Grupo DENV/SALINA:** infecção com 1×10^5 pfu de DENV-1 (IV) nas mães 14 dias antes do acasalamento e salina (IV) em G7-G10;
- **Grupo DENV/ZIKV:** infecção com 1×10^5 pfu de DENV-1 (IV) nas mães 14 dias antes do acasalamento e infecção com 1×10^5 pfu de ZIKV (IV) em G7-G10.

A Figura 3 mostra o resumo do desenho experimental realizado no presente estudo.

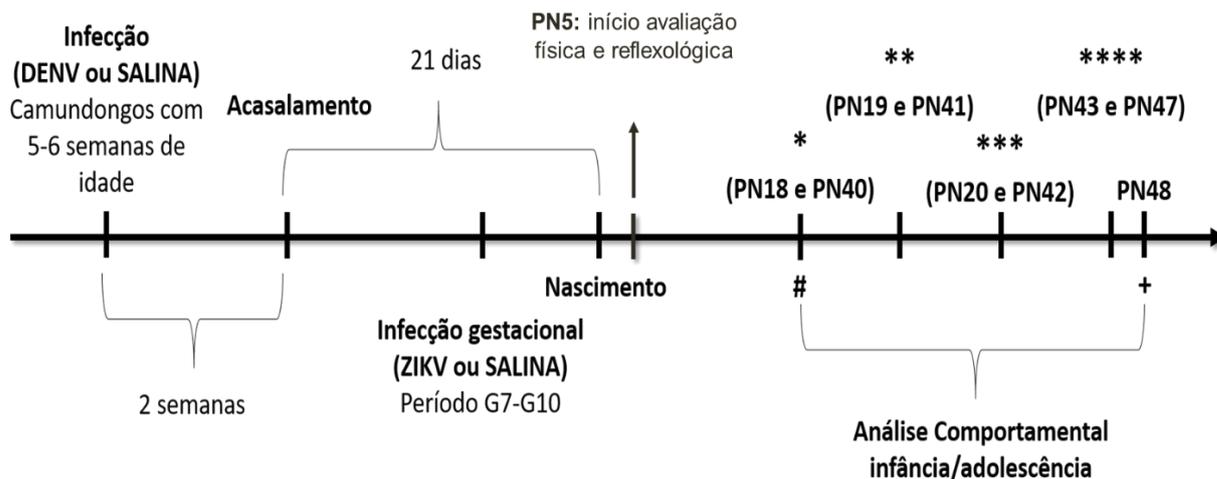


Figura 3 - Desenho experimental: Camundongos Swiss fêmeas, com idade entre 5-6 semanas, foram infectadas com DENV-1 ou SALINA. Após período de imunização e confirmação por ELISA, as fêmeas foram submetidas ao acasalamento direcionado.

Fonte: da Autora.

Nota: A infecção com ZIKV ou SALINA foi efetuada dentro da faixa gestacional estabelecida (G7-G10). A partir de PN5, e em dias estabelecidos previamente, foram realizadas avaliações físicas e reflexológicas nas proles. Para a avaliação comportamental, durante a infância (PN18, PN19 e PN20) e adolescência (PN40, PN41 e PN42), foram realizados os testes de (*) campo aberto, (**) labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris, utilizado para avaliar a (***) acuidade visual e a (****) memória de referência espacial, em que os animais foram treinados durante cinco dias na adolescência e submetidos ao (+) teste sem a plataforma 24 horas após o treino. Para quantificação de BDNF em diferentes estruturas encefálicas (#), diferente conjunto de animais foram eutanasiados em PN18 (infância).

5.3 ENSAIO DA IMUNOADSORÇÃO ENZIMÁTICA PARA DETECÇÃO DE ANTICORPOS IgM E IgG ANTI-DENV-1 E ANTI-ZIKV NAS FÊMEAS-MÃES

O sangue das fêmeas-mães foi coletado em dois períodos distintos: após período de 14 dias da infecção prévia com DENV-1; e após o período de desmame (PN20) das ninhadas (detecção de anticorpos anti-DENV-1 e anti-ZIKV), sendo realizada uma punção na veia caudal e punção intracardiaca, respectivamente. Em seguida, o sangue total foi centrifugado (por 10 minutos a 1200 rpm) para separação e obtenção do soro, sendo estes armazenados sob refrigeração (-20°C) para preservação dos anticorpos.

As amostras foram submetidas a ensaios de ELISA para detecção de anticorpos IgM e IgG total utilizando o DENV-1 e o ZIKV como antígenos. Para a

realização do ELISA, foram utilizadas placas de microtitulação de 96 poços Nunc MaxiSorp® (eBIO SCIENCE, EUA). Os poços foram revestidos com DENV-1 (500 pfu/poço) ou ZIKV (500 pfu/poço) diluídos em tampão carbonato-bicarbonato (0,1 M pH 9,6). Foram adicionados 100 µL da solução por poço e a placa incubada overnight a 4°C. No dia seguinte, lavou-se a placa três vezes com solução de PBS contendo 0,05% de Tween 20 (PBS-T), 300 µL por poço, sendo em seguida, bloqueada com 200 µL de PBS-T acrescido de 5% de leite em pó desnatado (Molico® Nestlé) durante 2 horas a 37°C. Após este período, a placa foi lavada três vezes com PBS-T, 300 µL por poço, e posteriormente adicionou-se 96 µL de PBS-T e 4 µL dos soros dos animais, em uma concentração final de 1:25. Incubou-se a placa por 1 hora a 37°C. Nos poços controle (branco), foram adicionados 100 µL do PBS-T. Após esse período, a placa foi lavada novamente quatro vezes com PBS-T, 300 µL por poço, e acrescidos 100 µL de anticorpos anti-IgM ou anti-IgG de camundongo conjugado à peroxidase (Sigma-Aldrich, EUA) diluído 1:2000 em PBS-T, por poço. A placa foi incubada novamente por 1 hora a 37°C. Em seguida, a placa foi lavada quatro vezes com PBS-T, 300 µL por poço, e depois adicionados 100 µL por poço de uma solução de Dicloridrato de O-Fenilenodiamina (OPD) (Sigma-Aldrich, EUA) em tampão citrato-fosfato (0,1 M de ácido cítrico, 0,1 M de fosfato de sódio, pH 4,5) com 0,08% de H₂O₂. Após a adição da solução, incubou-se a placa por 15 minutos à temperatura ambiente, protegida da luz. Para parar a reação, foram adicionados 50 µL de H₂SO₄ 2M por poço. As densidades ópticas foram obtidas a 450 nm em um leitor de microplacas (AnthosZenyth 200rt) (SILVA et al., 2012).

5.4 RT-PCR: PESQUISA DE PARTÍCULAS VIRAIS DE ZIKV EM TECIDO ENCEFÁLICO DOS FILHOTES

O RNA viral foi extraído dos tecidos alvos (encéfalo dos neonatos) utilizando o reagente Trizol (Thermo Fischer) conforme instruções do fabricante. O RNA obtido foi quantificado por espectrofotometria e 5 microgramas do mesmo foram usados em reações de transcrição reversa, utilizando oligos específicos para quantificação por PCR em tempo real do ZIKV (FAYE et al., 2013). De modo geral, as reações de transcrição reversa (RT) foram preparadas utilizando o oligo antisense para o ZIKV (5'- CCRCTCCCYCTYTGGTCTTG-3') juntamente com 5 µg de RNA total e 200 unidades da enzima transcriptase reversa MMLV-RT (Promega, USA). A reação foi incubada à 37°C por 1 hora e 30 minutos, a fim de promover a síntese do DNA complementar.

As reações de PCR em tempo real para quantificação do RNA viral foram realizadas no aparelho StepOne Real Time PCR (Applied Biosystems, USA) utilizando 10 microlitros do cDNA, o reagente Taqman Gene Expression Master Mix (Thermo Fischer, USA) e os oligos senso (5'AARTACACATACCARAACAAAGTGGT 3'), antisense (5'- CCRCTCCCYCTYTGGTCTTG-3') e sonda (FAM-CTYAGACCAGCTGAAR-BBQ) específicas para a amplificação de uma região da proteína NS5 do ZIKV, conforme instruções do fabricante. Diluições seriadas de um plasmídeo contendo o gene NS5 clonado foram utilizados para a construção de uma curva padrão para quantificação relativa do genoma viral nas amostras.

5.5 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO

Para a avaliação do desenvolvimento reprodutivo dos camundongos fêmeas foram avaliados os seguintes parâmetros: número de filhotes vivos/mortos ou com possíveis alterações físicas, número total de filhotes por ninhada, peso total da ninhada, número total de filhotes fêmeas e machos de cada fêmea-mãe.

5.6 AVALIAÇÃO FÍSICA E REFLEXOLÓGICA DAS PROLES

O dia do nascimento das proles foi considerado o dia pós-natal zero (PN0). As proles foram manipuladas no primeiro dia de vida (PN1) para que todas as fêmeas-mães ficassem com um número igual de filhotes ($n=8$ /grupo, sendo 4 machos e 4 fêmeas), evitando as variáveis de desenvolvimento relacionadas ao tamanho das ninhadas. Os demais filhotes foram submetidos à eutanásia por deslocamento cervical e seus encéfalos foram reservados para o teste de PCR em tempo real para ZIKV. É importante ressaltar que o protocolo experimental do presente estudo envolve a análise de filhotes machos e fêmeas oriundos dos tratamentos realizados.

A fim de diminuir qualquer estresse ou abandono dos filhotes pela mãe, o manuseio das proles sempre foi realizado com delicadeza, atentando-se para a correta higienização das mãos, seguida pela “lavagem” na maravalha suja da gaiola antes de tocá-los. No dia do nascimento realizou-se apenas a observação do número de filhotes nascidos. Somente em PN1 os filhotes foram pesados e sexados pelo método da distância anogenital.

Após o desmame, em PN20, os animais foram separados em mini-isoladores na *rack* ventilada pelo gênero e tratamento. As medidas físicas e reflexológicas foram realizadas entre PN5 e PN41, tendo sido registrado o dia do aparecimento de cada parâmetro avaliado (NORTON, 1989).

O peso e comprimento de cada filhote foram avaliados em PN5, PN12, PN15, PN17, PN24, PN28, PN31, PN35 e PN41 (UNITED STATES, 1998; TYL & MARR, 2006).

5.6.1 Parâmetros físicos

Os parâmetros físicos descritos a seguir foram acompanhados em todas as proles. A avaliação de cada animal foi iniciada em PN1:

- a) Aparecimento de pelos: dia do aparecimento de cerdas na superfície dorsal de cada filhote identificado.
- b) Desdobramento de orelhas: dia do destacamento da orelha direita ou esquerda da lateral da cabeça.
- c) Erupção de dentes incisivos: dia no qual os dentes incisivos tornam-se visíveis.
- d) Abertura de olhos: dia no qual há uma fenda na membrana de qualquer um dos olhos.
- e) Abertura de ouvidos: dia no qual se constata a abertura do conduto auditivo de pelo menos um dos lados.
- f) Abertura do canal vaginal: dia em que o septo é completamente aberto. Aplica-se leve pressão na lateral do canal vaginal para verificar se o septo ou a membrana permanecem. Quando a membrana está presente, a área tem uma aparência levemente enrugada, entretanto, quando a membrana é rompida, a abertura vaginal é aproximadamente do tamanho da cabeça de um alfinete.
- g) Descida dos testículos: dia no qual há a presença de 1 ou 2 testículos no escroto.
- h) Separação do prepúcio: dia no qual há a retração manual completa do prepúcio da glândula do pênis. O prepúcio permanece ligado à superfície ventral da glândula do pênis pelo frênulo. Aplica-se leve pressão nas laterais do prepúcio.

5.6.2 Parâmetros reflexológicos

Os parâmetros reflexológicos descritos a seguir foram acompanhados em todas as proles. A avaliação de cada animal foi iniciada em PN1:

- a) Preensão palmar: dia de ausência de preensão de um objeto pontiagudo (clipe ou palito de dente), o qual toca a pata do filhote e este responde com a preensão palmar; este é o único reflexo que desaparece ao longo do tempo.
- b) Endireitamento de postura: dia no qual o filhote é colocado em decúbito dorsal numa superfície plana e se vira para se posicionar em decúbito ventral, com as 4 patas apoiadas sobre a superfície em 20 segundos.
- c) Geotaxia negativa: dia no qual o filhote, que é colocado sobre uma rampa com inclinação de 45° e com a cabeça voltada para baixo, gira 180° para posicionar-se com a cabeça para cima em 30 segundos.
- d) Andar adulto: dia no qual o animal passa a andar apoiado sobre as 4 patas sem encostar o ventre na superfície.
- e) Endireitamento postural em queda livre: o observador segura o filhote com a cabeça voltada para cima, a cerca de 40 cm de uma superfície macia e confortável. A seguir, solta-se o filhote e este deve girar no ar e pousar sobre 4 patas. Anota-se o dia de aparecimento deste reflexo.
- f) Reflexo auditivo: o filhote é colocado em béquer com cerca de 600mL de maravalha, numa sala silenciosa. Faz-se um ruído acima do béquer, mas sem tocá-lo e verifica se há presença de alguma resposta corporal (rápida e leve extensão dos membros posteriores, retração do corpo com imobilidade transitória, sobressalto). Anota-se o dia de aparecimento deste reflexo.
- g) Esquiva ao abismo: o filhote é colocado sobre uma plataforma, com suas patas dianteiras tocando sua margem. Anota-se o dia em que o filhote tenta engatinhar para longe da margem, dentro de 10 segundos.
- h) Orientação pela vibrissa: o filhote é suspenso delicadamente pela cauda, com a cabeça voltada para a margem de uma plataforma, com as vibrissas apenas tocando a superfície vertical. Anota-se o dia em que o filhote levanta a cabeça e estende as patas anteriores na direção da plataforma, fazendo movimentos de andar para longe da margem.

- i) Orientação visual: o filhote é suspenso delicadamente pela cauda, com a cabeça voltada para a margem de uma plataforma em posição um pouco mais distante da margem que no teste de localização pela vibrissa. Anota-se o dia em que o filhote levanta a cabeça e estende as patas anteriores na direção da plataforma, fazendo movimentos de andar para longe da margem.

5.7 ENSAIOS COMPORTAMENTAIS

A infância em roedores se estende até 30 dias pós-natal e a adolescência até 65 dias pós-natal (ANDREOLLO et al., 2012). Para avaliar os efeitos em médio e longo prazo da imunização prévia e da exposição gestacional aos tratamentos, os filhotes foram submetidos a ensaios comportamentais a partir do 18º dia pós-natal (PN18) para avaliação na infância e a partir do 40º dia pós-natal (PN40), para adolescência.

Na infância e adolescência dos camundongos foram realizados os testes de campo aberto (PN18 e PN40), labirinto em cruz elevado (PN19 e PN41) e labirinto aquático de Morris - plataforma visível (PN20 e PN42). Ainda, na adolescência dos camundongos, a partir de PN43, foi realizado o teste do labirinto aquático de Morris – memória de referência espacial. Após os testes comportamentais, os filhotes foram eutanasiados por deslocamento cervical.

Cabe destacar que os filhotes permaneceram com as mães até o final dos ensaios quando as análises foram realizadas durante a infância.

5.7.1 Campo aberto

A atividade geral dos animais foi avaliada por meio de observação direta dos mesmos em um campo aberto (uma arena circular de madeira com 40 cm de diâmetro e 32,5 cm de altura). Este aparelho foi construído com base naquele sugerido por Broadhurst (1960). Cada animal foi colocado, individualmente, no centro da arena do campo aberto e observado por um período de 15 minutos. Os parâmetros do repertório

comportamental de um camundongo em campo aberto avaliados foram: locomoção total e central (TORRES, 2013). O registro da atividade foi realizado com o auxílio de uma câmara digital. O *software* EthoVision® (Noldus, The Netherlands) foi utilizado para quantificar a distância percorrida por cada animal.

Após cada observação, o campo aberto foi limpo com uma solução de álcool-água 5%, antes da introdução do próximo animal, a fim de evitar possíveis rastros de odor deixados pelo sujeito anterior. Para evitar efeitos circadianos no comportamento dos camundongos, as observações de todos os animais foram realizadas sempre no mesmo horário, às 7h.

A Figura 4 ilustra o campo aberto utilizado durante o teste comportamental.

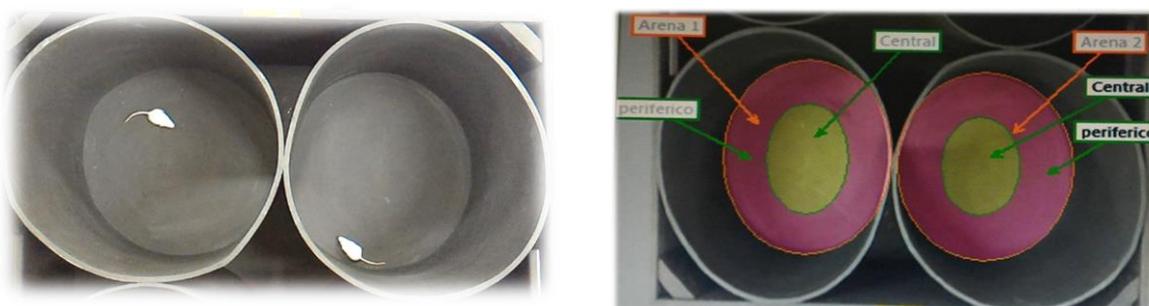


Figura 4 – Campo aberto. À esquerda, os campos abertos considerados para análise da atividade locomotora das proles. À direita, representação das áreas periférica e central estabelecidas pelo *software* EthoVision® utilizado para a análise dos resultados.

Fonte: da Autora.

5.7.2 Labirinto em cruz elevado

O labirinto em cruz elevado consiste em dois braços abertos (30 x 5 x 0,25 cm) e dois braços fechados de mesmo tamanho, porém, com paredes de 20 cm de altura. Os braços similares são cruzados em ângulo reto, conectados por uma área central. O aparelho foi elevado a 60 cm do chão. Durante 5 minutos os animais foram avaliados individualmente por medida manual. Observou-se o tempo gasto na exploração dos braços abertos e dos braços fechados (PELLOW et al., 1985). Ainda, foi observado o comportamento relacionado ao *grooming* de cada animal. O teste em labirinto em cruz elevado foi realizado 24h após a realização do campo aberto.

A Figura 5 ilustra o labirinto em cruz elevado utilizado durante o teste comportamental.

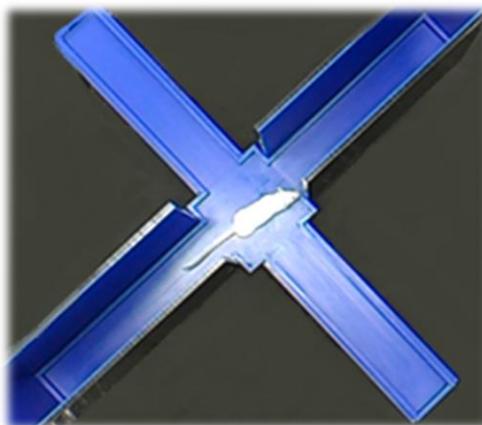


Figura 5 – Labirinto em cruz elevado utilizado para análise da ansiedade nos animais do presente estudo.

Fonte: da Autora.

5.7.3 Labirinto aquático de Morris - plataforma visível

No teste em labirinto aquático com plataforma visível, os animais precisam aprender a associar uma pista visual proximal com a resposta de chegar a esta pista, o que requer acuidade visual preservada (ROW et al., 2002). O labirinto aquático de Morris consiste em um tanque circular (90 cm de diâmetro x 50 cm de altura) contendo água a $25^{\circ} \text{C} \pm 2^{\circ} \text{C}$ até o nível de 44 cm. Uma plataforma circular (9 cm de diâmetro) em acrílico transparente foi colocada a 1 cm abaixo do nível da água. Adicionou-se leite em pó desnatado para tornar a água opaca. Sobre a plataforma foi posicionado um objeto como forma de sinalizar a localização da plataforma submersa. O labirinto foi dividido em quatro quadrantes imaginários simétricos. Os animais foram colocados no labirinto com o focinho voltado para a parede. O ponto de onde o animal foi liberado, bem como a localização da plataforma pelos quadrantes, variava de forma padronizada a cada tentativa (quatro tentativas por animal) e cada animal poderia nadar por até 3 minutos/tentativa. Ao encontrar a plataforma, o animal permanecia no local por cerca de 20 segundos e caso não a encontrasse, era guiado gentilmente pelo experimentador até a plataforma, onde permanecia por 10 segundos (BERRY;

MATTHEWS, 2004). O tempo de latência para que o animal encontrasse a plataforma foi avaliado manualmente. O teste em labirinto aquático de Morris foi realizado 24h após a realização do labirinto em cruz elevado.

A Figura 6 ilustra o labirinto aquático de Morris (com uma plataforma sinalizada) utilizado durante o ensaio comportamental.

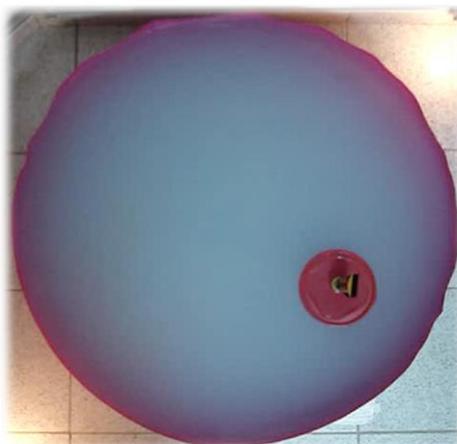


Figura 6 – Labirinto aquático de Morris com plataforma visível utilizado para análise da acuidade visual nos animais do presente estudo.

Fonte: da Autora.

5.7.4 Labirinto aquático de Morris - memória de referência espacial

Para este teste, foi usado como equipamento o mesmo tanque circular (com as mesmas medidas) utilizado para avaliar a acuidade visual dos camundongos. O labirinto foi colocado em uma sala contendo pistas visuais na parede, que serviram de referência para que o animal localizasse a plataforma submersa. O protocolo neste ensaio foi semelhante ao teste da plataforma visível, no entanto, neste ensaio o animal não é capaz de visualizar a plataforma, devendo se guiar pelas pistas ambientais para localizá-la. Os animais foram colocados no aparelho sempre com o focinho voltado para a parede, sendo que o ponto de partida de onde o animal foi liberado variava a cada tentativa e a cada dia. Cada animal pode nadar por até 60 segundos por tentativa. Ao encontrar a plataforma, o animal permanecia no local por cerca de 10 segundos e caso não a encontrasse, era guiado gentilmente pelo pesquisador até a

plataforma, onde permanecia por 10 segundos (BERRY; MATTHEWS, 2004). O labirinto foi dividido em quatro quadrantes imaginários simétricos.

Com o objetivo de avaliar a memória de referência espacial a plataforma submersa sempre foi mantida em uma única localização no labirinto, no centro de um dos quadrantes imaginários em todas as tentativas e em todos os dias de treinamento. Durante a infância, o teste de memória não foi realizado, tendo em vista a redução na acuidade visual de alguns animais analisados. Na adolescência, cada animal foi treinado por meio de uma sessão diária contendo quatro tentativas, durante cinco dias (PN43 - 47), totalizando 20 tentativas/animal ao final dessa fase.

Após 24 horas da última sessão de treino, foi realizado o teste da memória de referência espacial, em que a plataforma foi retirada do labirinto e cada animal foi submetido a 60 segundos de nado livre. O número de vezes em que o animal atravessou o local da plataforma, a distância percorrida e o tempo de permanência no quadrante alvo (quadrante em que estava localizada a plataforma durante os treinos), bem como no contador (área correspondente a quatro vezes a área da plataforma; Figura 7) foram registrados. O teste foi registrado com o auxílio de uma câmera digital posicionada acima do labirinto e o *software* EthoVision® (Noldus, The Netherlands) foi usado para avaliar os parâmetros de cada animal.

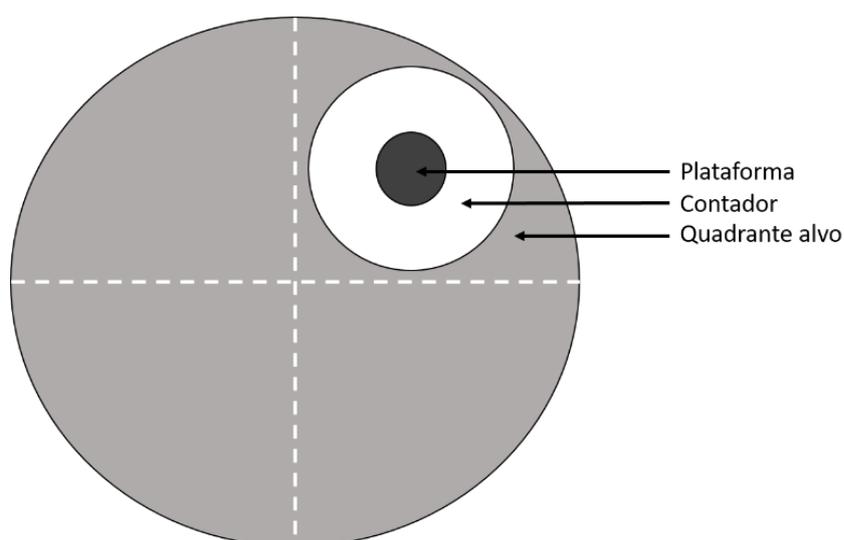


Figura 7 – Representação esquemática do labirinto aquático de Morris: em cinza escuro, a localização da plataforma nos dias de treinamento; em branco, o contador (a região da plataforma está contida no contador). O quadrante alvo contém a região da plataforma e do contador.

Fonte: da Autora.

5.8 QUANTIFICAÇÃO DE BDNF

A quantificação do BDNF foi realizada por meio do kit BDNF Emax[®] ImmunoAssay System (Promega) e protocolo adaptado (SZAPACS et al., 2004). Adicionou-se 4 mL de tampão de lise [137 mM NaCl, 200 mM Tris-HCl (pH 8,0), 0,2% Triton X-100, 10% glicerol, 1 mM PMSF e coquetel inibidor de protease 1:1000 (Sigma)] em cada tubo contendo as amostras. Após homogeneização, as amostras foram centrifugadas a 16.000 g por 30 minutos a 4 °C e o sobrenadante armazenado a -80 °C até o momento da análise.

A microplaca utilizada no ensaio foi revestida com 100 µL de Anti-BDNFmAb diluído em tampão carbonato 0,025 M (pH 9,7) (10 µL de Anti-BDNFmAb e 9,99 mL de tampão de carbonato), selada e submetida à incubação *overnight* a 4 °C. Após incubação, o conteúdo dos poços foi removido e a microplaca lavada vigorosamente com tampão de lavagem TBS-t (Tris-HCl 20 mM (pH 7,6); NaCl 150 mM; Tween[®] 20 0,05%). Em seguida, foram adicionados 200 µL de tampão Amostra & Block 1X em cada poço. A microplaca foi incubada à temperatura ambiente por 1 hora e lavada com TBS-t.

Após o preparo da curva padrão de BDNF, foram adicionados 100 µL dos padrões ou amostras em cada um dos poços. A microplaca foi selada e incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação. Posteriormente, a microplaca foi lavada cinco vezes com tampão de lavagem TBS-t. Em seguida, foram adicionados 100 µL do anticorpo anti-humano BDNF pAb diluído (20 µL do BDNF pAb anti-humano e 9,98 mL de tampão Amostra & Block 1X – diluição 1:500). A microplaca foi selada e incubada por duas horas à temperatura ambiente sob agitação. Após nova série de lavagens com tampão de lavagem TBS-t, foram adicionados cuidadosamente 100 µL do anticorpo Anti-IgY HRP conjugado diluído (50 µL do Anti-IgY HRP Conjugado e 9,95 mL de tampão Amostra & Block 1X – diluição 1:200). A microplaca foi novamente incubada por uma hora a temperatura ambiente sob agitação e então, submetida a cinco lavagens com tampão de lavagem TBS-t. Finalmente, foram adicionados 100 µL de solução de *TMB one* e a microplaca foi incubada à temperatura ambiente sob agitação durante 10 minutos. Em seguida foram adicionados 100 µL de ácido

clorídrico 1N para interromper a reação. A leitura espectrofotométrica foi realizada a 450 nm.

5.9 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Para os ensaios de ELISA, os grupos foram comparados por meio do Teste *t* não paramétrico, seguido pelo teste de Mann-Whitney (amostras antes do acasalamento para detecção de anticorpos anti-DENV-1) e por meio de análise de variância (ANOVA) não paramétrico, seguido pelo teste de múltipla comparação de Dunns (amostras depois do acasalamento para detecção de anticorpos anti-DENV-1 e anti-ZIKV). As análises estatísticas do RT-qPCR foram realizadas por meio do teste não paramétrico de Mann-Whitney.

As análises das medidas físicas/reflexológicas, bem como do BDNF, foram realizadas por meio de ANOVA uma via, seguidos pelos testes *post-hoc* de *Fisher* e *Student-Newman-Keuls*, respectivamente, para dados paramétricos. Na análise do peso e do comprimento dos animais, bem como nos ensaios comportamentais (campo aberto, labirinto em cruz elevado e labirinto aquático de Morris - plataforma visível), os grupos foram comparados por meio de ANOVA para medidas repetidas, seguido do teste *post-hoc Student-Newman-Keuls*, para dados paramétricos. Para o treino no labirinto aquático de Morris, após a análise por meio de ANOVA para medidas repetidas, os grupos foram comparados a cada dia, por meio de ANOVA uma via, seguido pelo teste *post-hoc Student-Newman-Keuls*, para dados paramétricos.

Os dados foram apresentados como média \pm EPM (erro padrão da média) e considerados significativamente diferentes para valores de $p < 0,05$.

6 RESULTADOS

Os primeiros resultados apresentados referem-se aos ensaios imunológicos e moleculares realizados.

6.1 ELISA PARA PESQUISA DE ANTICORPOS E CONFIRMAÇÃO DAS INFECÇÕES NAS FÊMEAS-MÃES

As amostras de soro coletadas das fêmeas-mães em dois períodos distintos foram submetidas a detecção de anticorpos IgM e IgG anti-DENV-1 e anti-ZIKV. É importante ressaltar que não foram identificadas quantidades significativas de anticorpos IgM circulante para ambos os vírus estudados. Porém, níveis significativos de anticorpos IgG para os dois vírus foram identificados pelo método de ELISA.

As Figuras 8 e 9 apresentam, respectivamente, os dados obtidos para a detecção de anticorpos IgG anti-DENV-1 antes do acasalamento e detecção de anticorpos anti-DENV-1 e anti-ZIKV depois do acasalamento. A linha pontilhada indica o ponto de corte (*cut-off*), ou seja, todas as fêmeas-mães que apresentaram valores acima do ponto de corte foram consideradas positivas para o ELISA.

A Figura 8 mostra que houve a produção de anticorpos IgG anti-DENV-1 nas fêmeas inoculadas previamente com DENV-1, quando comparadas as fêmeas inoculadas com SALINA ($p < 0,01$).

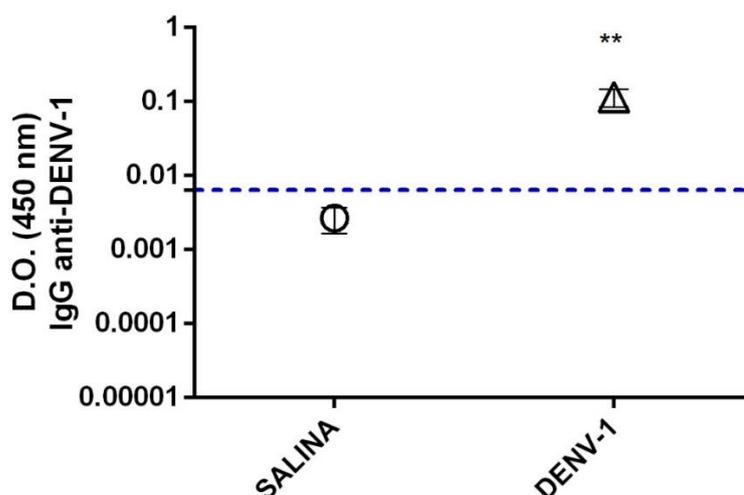


Figura 8 - Detecção de anticorpos IgG anti-DENV-1 após 14 dias da infecção com DENV-1 em camundongos Swiss fêmeas. A linha pontilhada indica o ponto de corte (*cut-off*); n = 8 fêmeas por grupo experimental. Dados expresso pela média \pm EPM. Teste *t* não paramétrico, seguido pelo teste de Mann-Whitney *post-hoc*. ** $p < 0,01$.

Fonte: da Autora

Em relação aos dados observados na Figura 9, é possível observar que não houve a produção de anticorpos anti-DENV-1 (Figura 9A) e anti-ZIKV (Figura 9B) nas fêmeas-controle SALINA/SALINA. Já os animais que foram inoculados com salina antes do acasalamento e, durante a gestação foram infectados com ZIKV, apresentaram positividade contra o DENV-1 e baixa reatividade contra o ZIKV (apenas 1 resultado positivo - 25%). Nos animais infectados previamente com DENV-1, é possível observar que houve a produção de anticorpos contra o DENV-1 em ambos os grupos: DENV/SALINA e DENV/ZIKV. Entretanto, apenas o grupo DENV/ZIKV apresentou diferença estatisticamente significativa para a detecção de anticorpos anti-DENV-1 e anti-ZIKV, quando comparado ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,01$) depois do acasalamento. Estes dados indicam que a presença de uma imunidade prévia para o DENV-1 provavelmente influenciou uma elevada produção de anticorpos de reatividade cruzada.

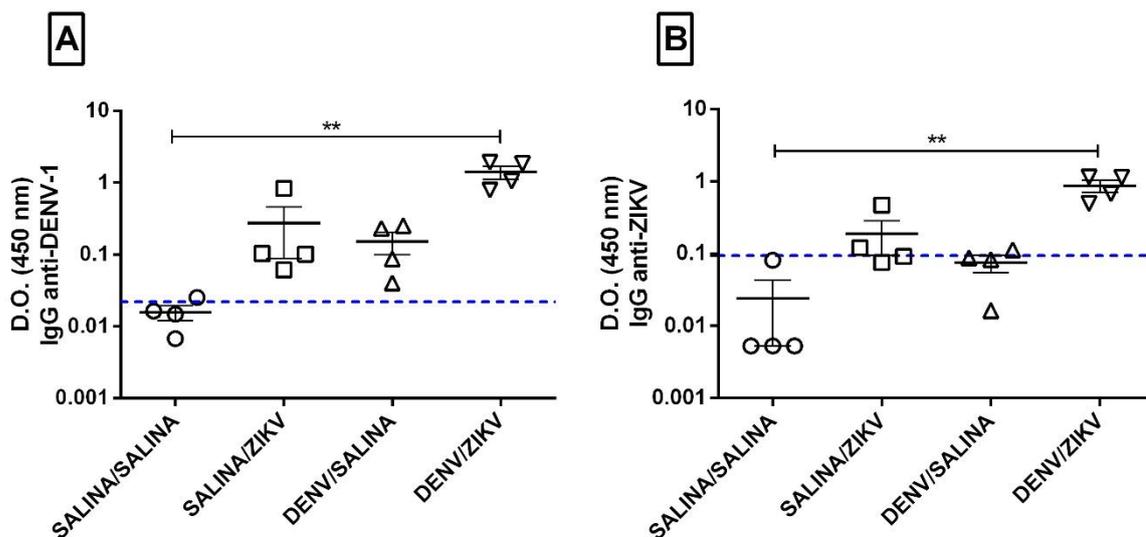


Figura 9 - Detecção de anticorpos IgG anti-DENV-1 e anti-ZIKV em camundongos Swiss fêmeas, após o período de desmame (PN20), com ou sem imunidade prévia ao DENV-1 e infectados com ZIKV durante o período gestacional. A linha pontilhada indica o ponto de corte (*cut-off*) e a linha contínua para cada grupo representa a mediana; n = 4 fêmeas-mães por grupo experimental. Dados expressos em média \pm EPM. ANOVA não paramétrico, seguido pelo teste de múltipla comparação de Dunns. **p < 0,01.

Fonte: da Autora

6.2 RT-qPCR PARA PESQUISA E QUANTIFICAÇÃO DE ZIKV EM TECIDO ENCEFÁLICO DE CAMUNDONGOS SWISS NEONATOS

A pesquisa por partículas virais de ZIKV no encéfalo de camundongos Swiss neonatos (PN1) apresentou resultados negativos para amplificação e quantificação, demonstrando a ausência do vírus no tecido encefálico desses animais.

6.3 AVALIAÇÃO DO DESEMPENHO REPRODUTIVO

A Tabela 2 mostra os parâmetros reprodutivos das proles provenientes de camundongos fêmeas expostos ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Os dados de peso, comprimento e sexagem foram coletados em PN1. A análise estatística mostra que só houve diferença no número de filhotes fêmeas, em que as proles SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) apresentaram menor quantidade de filhotes fêmeas, quando comparadas ao grupo controle SALINA/SALINA e DENV/ZIKV.

Tabela 2 - Parâmetros reprodutivos de camundongos fêmeas expostas ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1; $n = 4$ proles por grupo experimental. Dados expressos como média \pm EPM. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste *Fisher post-hoc*. * $p < 0,05$ comparado aos grupos SALINA/SALINA e SALINA/ZIKV.

Dados Reprodutivos	SALINA/SALINA	SALINA/ZIKV	DENV/SALINA	DENV/ZIKV
Nº total de filhotes	14,00 \pm 0,82	11,75 \pm 0,75	12,75 \pm 1,25	12,00 \pm 0,41
Peso ninhada (g)	29,76 \pm 0,65	24,99 \pm 1,16	28,65 \pm 1,72	27,01 \pm 2,53
Comprimento médio (cm)	3,36 \pm 0,07	3,35 \pm 0,03	3,39 \pm 0,11	3,37 \pm 0,08
Morte perinatal (%)	0	0	0	0,25 \pm 0,25
Nº filhotes machos	7,00 \pm 0,41	8,00 \pm 0,41	7,00 \pm 1,78	5,50 \pm 0,29
Nº filhotes fêmeas	7,00 \pm 1,08	3,75 \pm 0,48 *	5,75 \pm 0,85	6,50 \pm 0,50

Fonte: da Autora

6.4 AVALIAÇÃO FÍSICA E REFLEXOLÓGICA DAS PROLES

As Tabelas 3 e 4 apresentam, respectivamente, os dados referentes aos parâmetros de desenvolvimento físico e reflexológico analisados nos filhotes machos e fêmeas provenientes de camundongos fêmeas expostas ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Os resultados da avaliação física e reflexológica das proles não mostrou efeito de gênero para nenhum dos parâmetros mensurados, exceto para àqueles relacionados ao desenvolvimento dos órgãos reprodutores nos animais, como abertura do canal vaginal ($F_{1,24} = 3499,20$; $p < 0,001$) e descida dos testículos ($F_{1,24} = 4216,03$; $p < 0,001$).

Na Tabela 3 é possível verificar que os filhotes, fêmeas e machos, das proles DENV/SALINA obtiveram detecção tardia do parâmetro referente ao aparecimento de pelos quando comparadas aos filhotes do grupo SALINA/SALINA ($p < 0,05$). Esses mesmos animais apresentaram abertura precoce dos olhos em relação aos filhotes SALINA/SALINA ($p < 0,001$), SALINA/ZIKV ($p < 0,01$) e DENV/ZIKV ($p < 0,001$). Para a abertura do canal vaginal, foi possível observar que fêmeas DENV/SALINA apresentaram detecção precoce desse parâmetro quando comparadas às fêmeas dos grupos SALINA/SALINA ($p < 0,01$), SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) e DENV/ZIKV ($p < 0,01$). No que se refere à descida dos testículos, é possível observar que nas proles DENV/ZIKV este parâmetro foi detectado com maior antecedência, quando comparado aos demais grupos ($p < 0,05$). Ainda, machos DENV/SALINA apresentaram separação precoce do prepúcio quando comparados aos machos SALINA/ZIKV ($p < 0,05$).

Tabela 3 - Parâmetros do desenvolvimento físico dos filhotes provenientes de camundongos fêmeas expostas ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Os dados estão expressos em dias após o nascimento em que cada parâmetro foi detectado; n = 4 proles por grupo experimental. Filhotes fêmeas (F) e machos (M). Dados expressos como média \pm EPM. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste *Fisher post-hoc*. * $p < 0,05$ comparado ao grupo SALINA/SALINA; & $p < 0,05$ comparado ao grupo SALINA/ZIKV; ⁺ $p < 0,001$ comparado aos grupos SALINA/SALINA e DENV/ZIKV; ^{**} $p < 0,01$ comparado ao grupo SALINA/ZIKV; [@] $p < 0,01$ comparado aos grupos SALINA/SALINA e DENV/ZIKV; [#] $p < 0,05$ comparado aos demais grupos.

Parâmetros	Gênero	SALINA/SALINA (dias)	SALINA/ZIKV (dias)	DENV/SALINA (dias)	DENV/ZIKV (dias)
Aparecimento pelos	F	8,00 \pm 1,15	9,00 \pm 1,00	10,00 \pm 0,00*	9,00 \pm 1,00
	M	8,00 \pm 1,15	9,00 \pm 1,00	10,00 \pm 0,00*	9,00 \pm 1,00
Desdobramento orelhas	F	6,00 \pm 0,00	7,00 \pm 1,00	6,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00
	M	6,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00	6,00 \pm 0,00
Erupção dentes incisivos	F	12,25 \pm 0,75	12,25 \pm 0,75	13,00 \pm 0,00	12,25 \pm 0,75
	M	12,25 \pm 0,75	12,25 \pm 0,75	13,00 \pm 0,00	12,25 \pm 0,75
Abertura dos olhos	F	16,00 \pm 0,00	14,50 \pm 0,87	13,00 \pm 0,00* **	15,25 \pm 0,75
	M	15,25 \pm 0,75	15,25 \pm 0,75	13,00 \pm 0,00* **	15,25 \pm 0,75
Abertura dos ouvidos	F	12,25 \pm 0,75	13,00 \pm 1,22	13,00 \pm 0,00	12,25 \pm 0,75
	M	12,25 \pm 0,75	13,00 \pm 1,22	13,00 \pm 0,00	13,00 \pm 1,22
Abertura canal vaginal	F	28,00 \pm 1,00	27,00 \pm 1,15	25,00 \pm 0,00@ &	28,00 \pm 1,00
Descida dos testículos	M	24,25 \pm 0,75	23,50 \pm 0,87	23,50 \pm 0,87	22,00 \pm 0,00#
Separação do prepúcio	M	30,25 \pm 4,03	35,50 \pm 3,75	29,00 \pm 0,00&	29,75 \pm 2,29

Fonte: da Autora

Na Tabela 4 é possível observar que o parâmetro relativo à perda da preensão palmar foi detectado precocemente em todos os grupos com infecções quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$). Ainda, os dados referentes a geotaxia negativa demonstram que as proles DENV/SALINA expressaram esse parâmetro precocemente em relação ao grupo SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e ao grupo DENV/ZIKV ($p < 0,01$). No que se refere a orientação visual dos filhotes, é possível verificar, de acordo com a análise estatística, que as proles DENV/ZIKV expressaram esse parâmetro tardiamente, quando comparados ao grupo SALINA/SALINA ($p < 0,001$), SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) e DENV/SALINA ($p < 0,05$).

Tabela 4 - Parâmetros do desenvolvimento reflexológico dos filhotes provenientes de camundongos fêmeas expostas ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Os dados estão expressos em dias após o nascimento em que cada parâmetro avaliado foi detectado; n = 4 proles por grupo experimental. Filhotes fêmeas (F) e machos (M). Dados expressos como média \pm EPM. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste *Fisher post-hoc*. *p<0,05 comparado aos demais grupos; [&]p<0,05 comparado aos grupos SALINA/SALINA; [@]p<0,01 comparado ao grupo DENV/ZIKV; **p<0,001 comparado ao grupo SALINA/SALINA; ⁺p<0,05 comparado ao grupo SALINA/ZIKV e DENV/SALINA.

Parâmetros	Gênero	SALINA/SALINA (dias)	SALINA/ZIKV (dias)	DENV/SALINA (dias)	DENV/ZIKV (dias)
Preensão	F	23,00 \pm 2,74*	19,00 \pm 1,00	19,00 \pm 1,00	19,50 \pm 1,50
palmar	M	22,00 \pm 2,12*	19,00 \pm 1,00	19,00 \pm 1,00	18,50 \pm 1,26
Endireitamento	F	3,00 \pm 1,00	4,00 \pm 1,15	3,00 \pm 1,00	3,00 \pm 1,00
postural	M	3,00 \pm 1,00	5,00 \pm 1,00	5,00 \pm 1,00	4,00 \pm 1,15
Geotaxia	F	6,00 \pm 1,63	4,00 \pm 1,15	2,00 \pm 0,00 ^{&} [@]	8,50 \pm 2,50
negativa	M	7,00 \pm 1,00	6,00 \pm 1,63	3,00 \pm 1,00 ^{&} [@]	5,75 \pm 2,59
Andar adulto	F	13,75 \pm 1,44	14,50 \pm 0,87	13,00 \pm 0,00	14,50 \pm 0,87
	M	13,75 \pm 1,44	14,50 \pm 0,87	13,00 \pm 0,00	14,50 \pm 0,87
Endireitamento	F	17,75 \pm 1,84	19,50 \pm 1,50	17,25 \pm 1,89	20,50 \pm 1,50
postural em	M	17,75 \pm 1,84	18,50 \pm 1,26	16,00 \pm 2,12	20,50 \pm 1,50
queda livre					
Reflexo auditivo	F	13,00 \pm 0,00	13,75 \pm 0,75	13,00 \pm 0,00	13,00 \pm 0,00
	M	13,00 \pm 0,00	13,75 \pm 0,75	13,00 \pm 0,00	13,75 \pm 0,75
Esquiva ao	F	4,00 \pm 1,15	5,75 \pm 2,59	2,00 \pm 0,00	5,00 \pm 1,91
abismo	M	4,00 \pm 1,15	5,75 \pm 2,59	3,00 \pm 1,00	6,00 \pm 1,63
Orientação pela	F	12,75 \pm 2,36	12,00 \pm 2,12	13,00 \pm 0,00	12,75 \pm 2,36
vibrissa	M	12,75 \pm 2,36	12,00 \pm 2,12	13,00 \pm 0,00	12,75 \pm 2,36
Orientação	F	21,00 \pm 2,35	27,00 \pm 4,20	24,25 \pm 0,75	34,50 \pm 5,68** ⁺
visual	M	20,25 \pm 2,02	27,00 \pm 4,20	27,00 \pm 1,15	34,50 \pm 5,68** ⁺

Fonte: da Autora

Os resultados relativos ao peso dos animais avaliados demonstram que houve efeito estatístico para tratamento ($F_{3,80} = 4,68$; $p < 0,01$), gênero ($F_{1,80} = 17,77$; $p < 0,001$) e dia ($F_{11,880} = 5349,97$; $p < 0,001$), além de interação estatística entre tratamento e dia ($F_{33,880} = 3,46$; $p < 0,001$) e entre dia e gênero ($F_{11,880} = 42,15$; $p < 0,001$).

As Figuras 10 e 11 apresentam, respectivamente, os valores de peso médio (em gramas) dos filhotes, fêmeas e machos, provenientes de camundongos fêmeas expostas ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. É possível observar que os filhotes fêmeas DENV/SALINA apresentaram

redução no ganho de peso em PN17, PN24 e PN41, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$). Ainda, os filhotes fêmeas DENV/ZIKV apresentaram redução no ganho de peso em PN41, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$).

Em relação aos filhotes machos, é possível observar que apenas os animais DENV/SALINA apresentaram redução no ganho de peso em PN17, PN24, PN28, PN35 e PN41, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$).

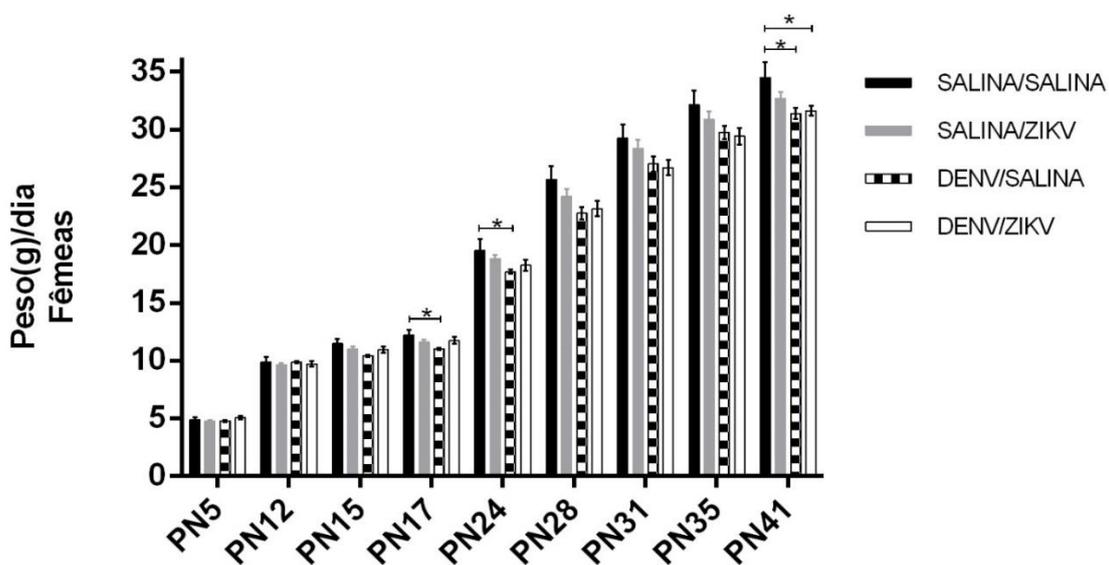


Figura 10 - Peso médio (g) de camundongos fêmeas. Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Dados expressos como média (g) \pm EPM. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$.

Fonte: da Autora

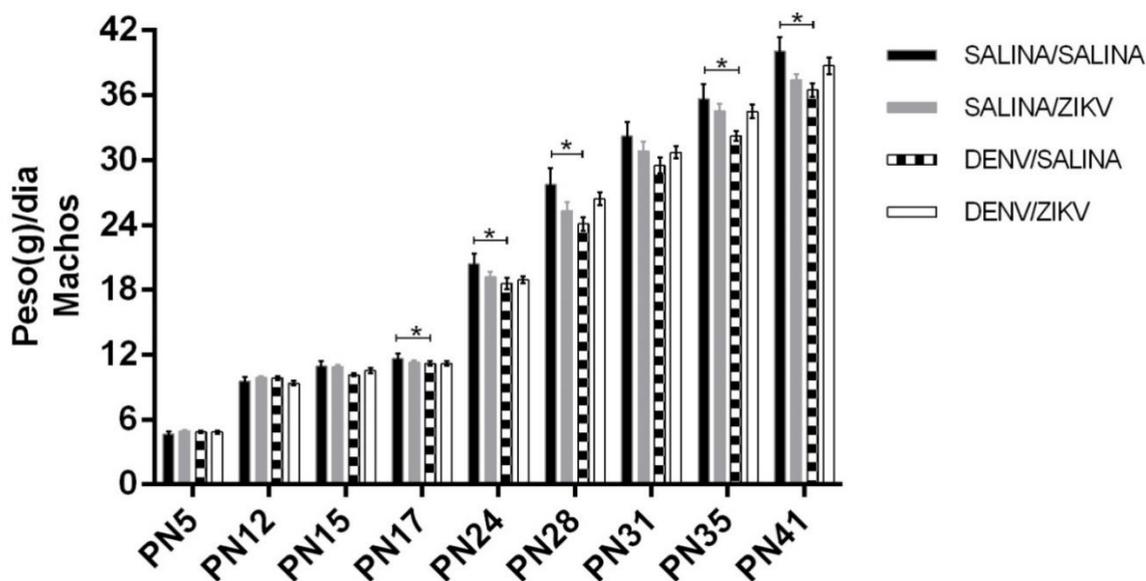


Figura 11 - Peso médio (g) de camundongos machos. Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Dados expressos como média (g) \pm EPM. Número de animais: n=11/gênero por grupo experimental. Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. *p<0,05.

Fonte: da Autora

A análise do comprimento dos animais, mostrou que houve efeito estatístico para os dias ($F_{11,880} = 8514,18$; $p < 0,001$), além de interação estatística entre tratamento e dia ($F_{33,880} = 3,81$; $p < 0,001$) e entre dia e gênero ($F_{11,880} = 7,78$; $p < 0,001$).

As Figuras 12 e 13 mostram, respectivamente, os valores de comprimento médio (em centímetros) dos filhotes, fêmeas e machos, provenientes de camundongos fêmeas expostas ou não ao ZIKV durante o período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. É possível observar que os filhotes fêmeas DENV/ZIKV apresentaram maior comprimento em PN5, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e ao grupo DENV/SALINA ($p < 0,05$). Ainda, as fêmeas DENV/SALINA apresentaram menor comprimento em PN15, quando comparados aos grupos SALINA/ZIKV ($p < 0,01$), aos grupos SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e DENV/ZIKV ($p < 0,05$).

Os mesmos resultados podem ser observados para os filhotes machos, em que os animais DENV/ZIKV apresentaram maior comprimento em PN5, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e ao grupo DENV/SALINA ($p < 0,05$). Machos DENV/SALINA apresentaram menor comprimento em PN15,

quando comparados aos grupos SALINA/ZIKV ($p < 0,01$), aos grupos SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e DENV/ZIKV ($p < 0,05$).

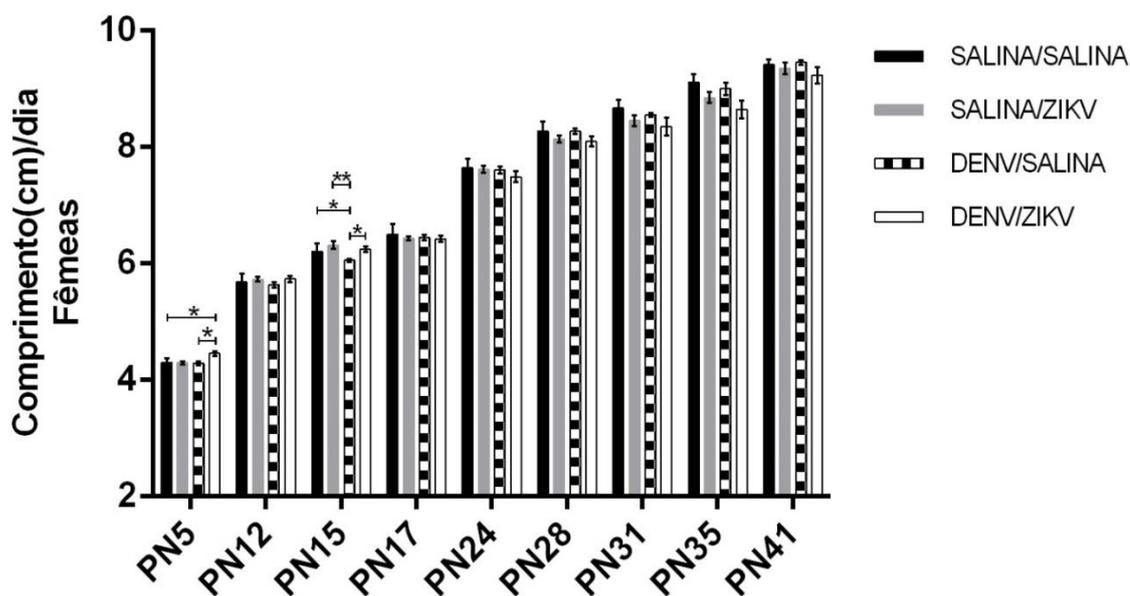


Figura 12 - Comprimento médio (cm) de camundongos fêmeas. Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Dados expressos como média (cm) \pm EPM. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: da Autora

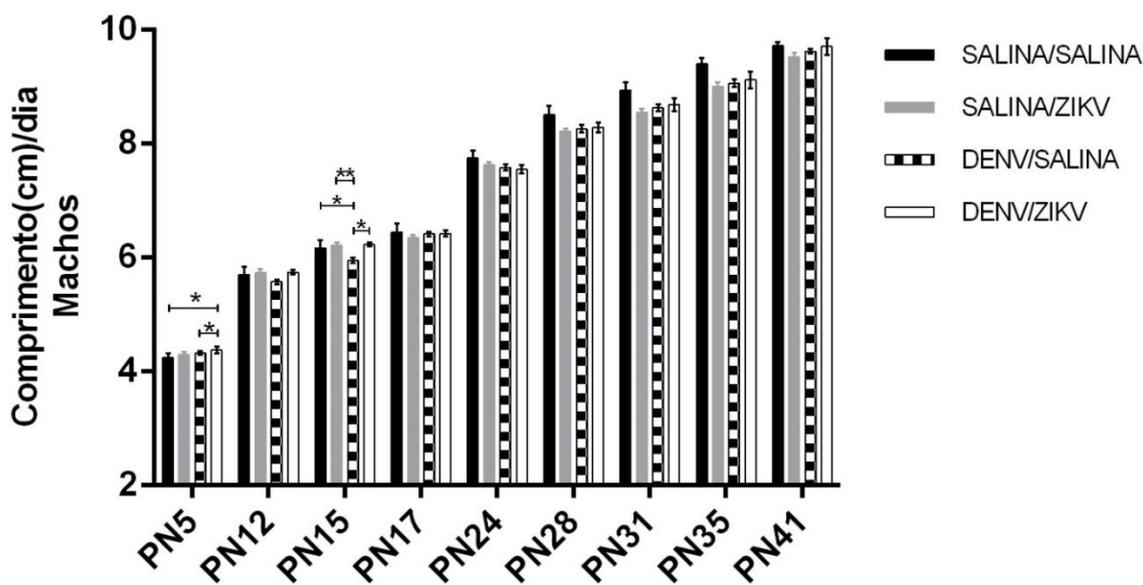


Figura 13 - Comprimento médio (cm) de camundongos machos. Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1. Dados expressos como média (cm) \pm EPM. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Teste ANOVA para medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: da Autora

6.5 ENSAIO EM CAMPO ABERTO: ATIVIDADE LOCOMOTORA

A Figura 14 apresenta os resultados da infância e adolescência obtidos em relação a locomoção total das proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1, enquanto a Figura 16 apresenta os resultados da infância e adolescência obtidos para a locomoção central em relação à locomoção total dos animais analisados.

A análise da locomoção total dos animais avaliados em campo aberto, mostrou que houve efeito estatístico para tratamento ($F_{3,80} = 4,34$; $p < 0,01$) e para idade ($F_{1,80} = 186,30$; $p < 0,001$), além de interação estatística entre tratamento e idade ($F_{3,80} = 4,09$; $p < 0,01$).

Durante a infância, é possível observar uma diminuição estatisticamente significativa da locomoção total dos filhotes SALINA/ZIKV, DENV/SALINA e DENV/ZIKV, machos e fêmeas, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,01$), como mostra a Figura 14A. Durante a adolescência, houve uma interação estatística entre tratamento e gênero ($F_{3,80} = 3,25$; $p < 0,05$). Assim, é possível observar, de acordo com os dados obtidos, que apenas as fêmeas SALINA/ZIKV apresentaram uma redução estatisticamente significativa na locomoção total, quando comparadas aos demais grupos, para ambos os gêneros ($p < 0,05$), como mostra a Figura 14B.

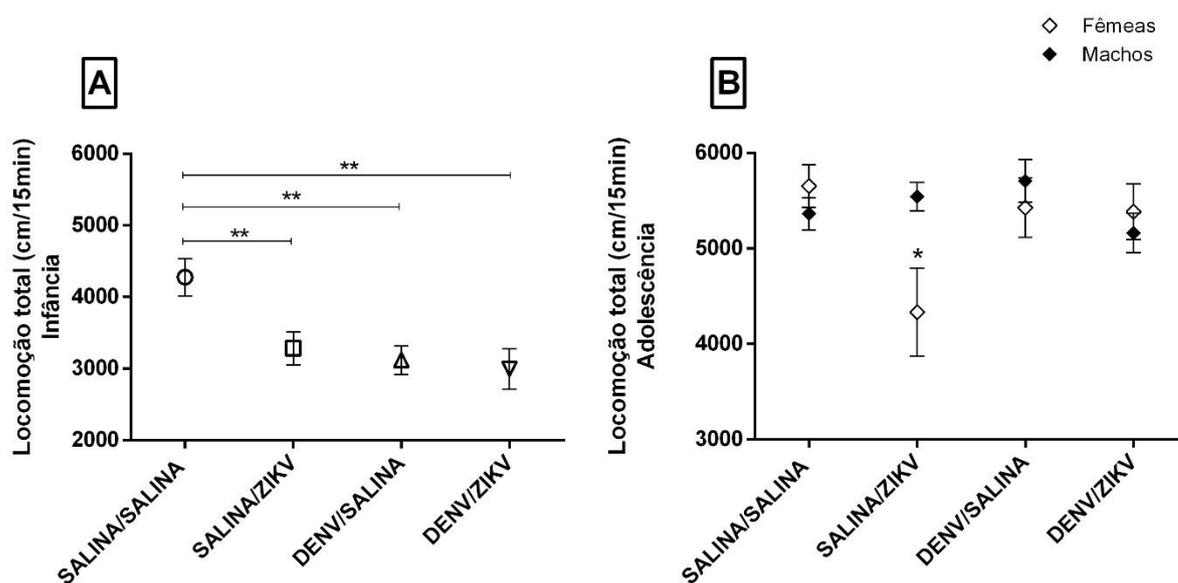


Figura 14 - Locomoção total em campo aberto durante a infância (PN18) e adolescência (PN40). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: n=11/gênero por grupo experimental. Dados expressos como média em centímetros percorridos por 15 minutos \pm EPM. ANOVA medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. *p<0,05; **p<0,01.

Fonte: da Autora

A análise da distância percorrida na área central em campo aberto, mostrou que houve apenas efeito estatístico para idade ($F_{1,80} = 256,92$; $p < 0,001$). Para ambas as idades, infância e adolescência, não foi observada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre os grupos avaliados (Figuras 15A e 15B).

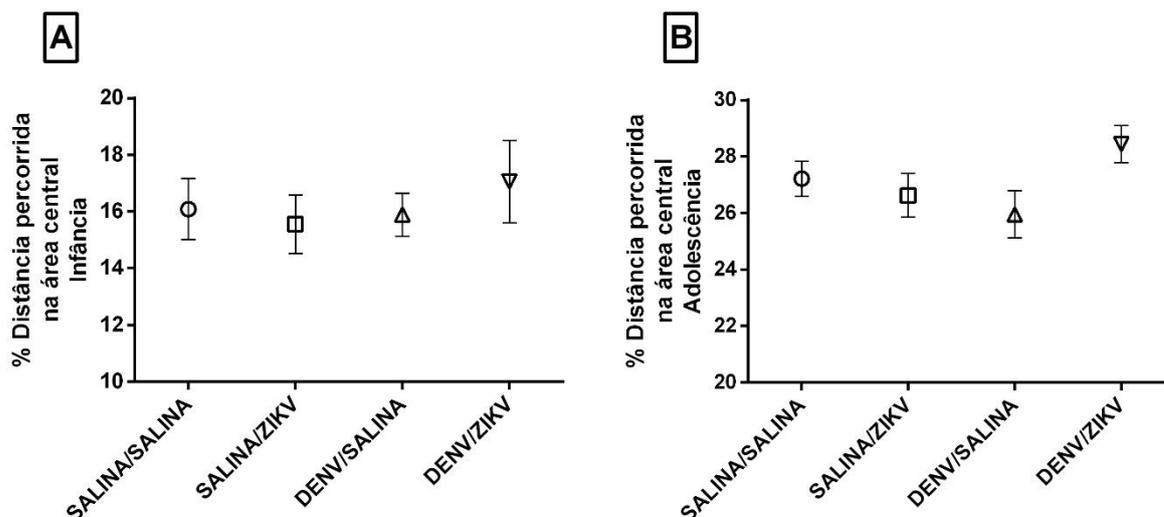


Figura 15 - Porcentagem de distância percorrida na área central do campo aberto em relação à locomoção total durante a infância (PN18) e adolescência (PN40). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: n=11/gênero por grupo experimental. Dados expressos como média em % da distância percorrida na área central \pm EPM. ANOVA medidas repetidas seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. $p > 0,05$.

Fonte: da Autora

6.6 ENSAIO EM LABIRINTO EM CRUZ ELEVADO: AVALIAÇÃO DA ANSIEDADE E PADRÃO DE *GROOMING* ASSOCIADO

A Figura 16 apresenta a porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto em cruz elevado, na infância e adolescência, em relação ao tempo total do teste (5 minutos), para as proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. A análise estatística indica que houve efeito estatístico para tratamento ($F_{3,80} = 15,56$; $p < 0,001$) e para idade ($F_{1,80} = 106,22$; $p < 0,001$), além de interação estatística entre tratamento e idade ($F_{3,80} = 7,43$; $p < 0,001$).

Na infância, todos os grupos experimentais apresentaram aumento estatisticamente significativo na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,01$ em relação ao grupo DENV/SALINA vs SALINA/SALINA; $p < 0,001$ em relação ao grupo SALINA/ZIKV vs SALINA/SALINA e DENV/ZIKV vs SALINA/SALINA), bem como o grupo SALINA/ZIKV em relação ao grupo DENV/SALINA ($p < 0,05$), como mostra a

Figura 16A. Ainda, na adolescência, todos os grupos apresentaram aumento estatisticamente significativo na porcentagem de tempo gasto nos braços abertos do labirinto, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,001$ em relação ao grupo SALINA/ZIKV vs SALINA/SALINA e DENV/SALINA vs SALINA/SALINA; $p < 0,05$ em relação ao grupo DENV/ZIKV vs SALINA/SALINA). A prole DENV/ZIKV apresentou uma redução estatisticamente significativa na porcentagem de tempo nos braços abertos do labirinto, quando comparados ao grupo DENV/SALINA ($p < 0,001$) e ao grupo SALINA/ZIKV ($p < 0,01$), como mostra a Figura 16B.

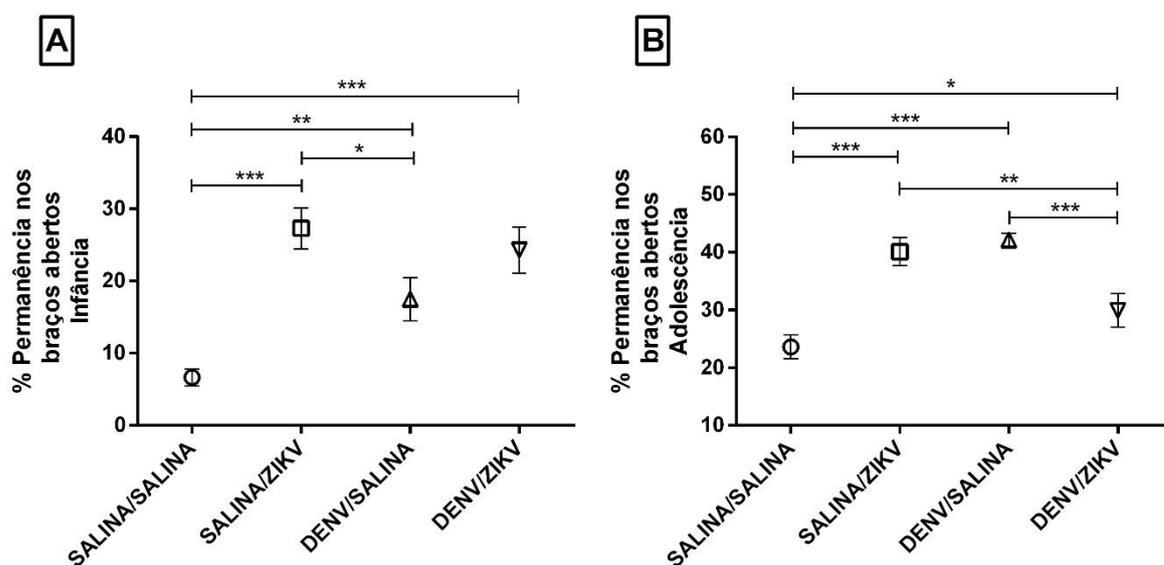


Figura 16 - Porcentagem da permanência nos braços abertos em relação ao tempo total de permanência nos braços do labirinto em cruz elevado durante a infância (PN19) e adolescência (PN41). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Dados expressos como média em % de tempo nos braços abertos \pm EPM. ANOVA medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: da Autora

A Figura 17 apresenta a frequência total de *grooming* no labirinto em cruz elevado, na infância e adolescência, para as proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. A análise dos dados indica que houve efeito estatístico para tratamento ($F_{3,80} = 9,59$; $p < 0,001$) e para idade ($F_{1,80} = 64,70$; $p < 0,001$).

Na infância, todos os grupos experimentais apresentaram uma redução estatisticamente significativa na frequência de *grooming*, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,01$ em relação ao grupo SALINA/ZIKV vs SALINA/SALINA; $p < 0,001$ em relação ao grupo DENV/SALINA vs SALINA/SALINA; $p < 0,05$ em relação ao grupo DENV/ZIKV vs SALINA/SALINA), como mostra a Figura 17A. Na adolescência, os grupos SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) e DENV/SALINA ($p < 0,01$) apresentaram redução estatisticamente significativa na frequência de *grooming* quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA. Ainda, as proles DENV/ZIKV apresentaram um aumento estatisticamente significativo na frequência de *grooming*, quando comparados ao grupo DENV/SALINA ($p < 0,05$) como mostra a Figura 17B.

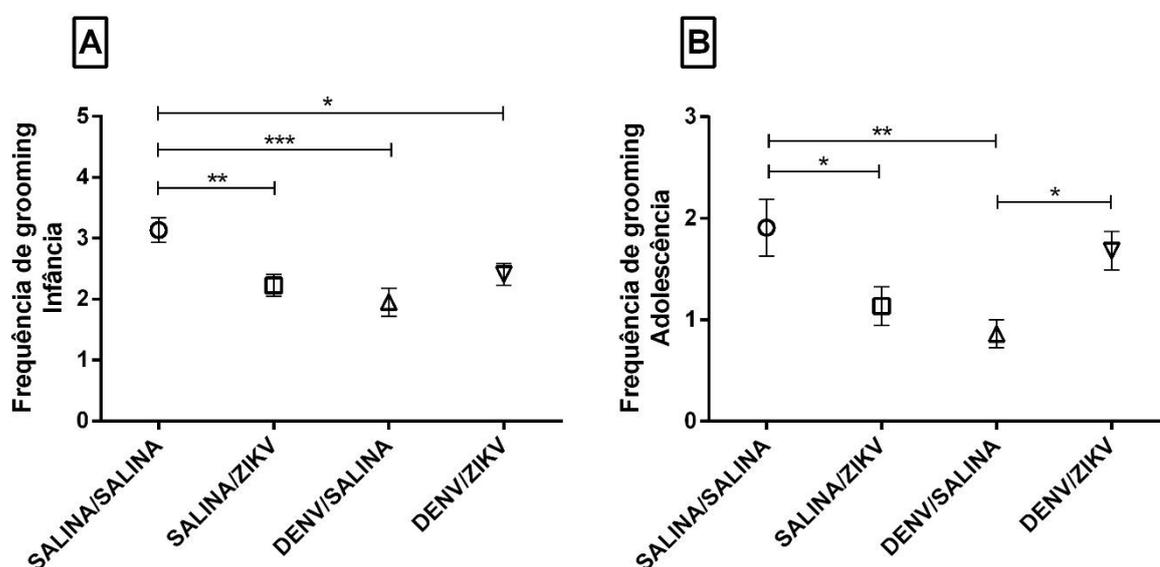


Figura 17- Frequência total de grooming no labirinto em cruz elevado durante a infância (PN19) e adolescência (PN41). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Dados expressos em números absolutos, como média da frequência de grooming \pm EPM. ANOVA medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: da Autora

A Figura 18 apresenta o tempo total de *grooming*, em segundos, no labirinto em cruz elevado, durante a infância e a adolescência, para as proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. A análise estatística indica que houve efeito estatístico para tratamento ($F_{3,80} = 5,36$; $p < 0,01$) e para idade ($F_{1,80} = 57,71$; $p < 0,001$).

Na infância, os grupos SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) e DENV/SALINA ($p < 0,01$) apresentaram uma redução estatisticamente significativa no tempo total de *grooming*, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA, como mostra a Figura 18A. Ainda, na adolescência, todos os grupos experimentais apresentaram uma redução estatisticamente significativa no tempo total de *grooming*, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$), como mostra a Figura 18B.

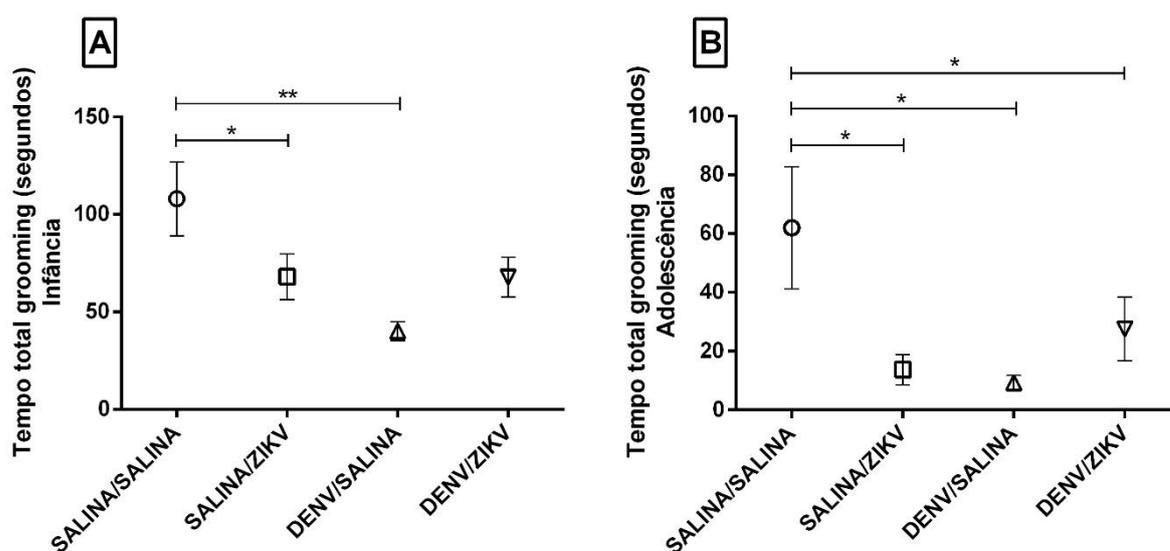


Figura 18 - Tempo total de grooming, em segundos, no labirinto em cruz elevado durante a infância (PN19) e adolescência (PN41). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Dados expressos como média em segundos \pm EPM. ANOVA medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Fonte: da Autora

6.7 ENSAIO EM LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS (PLATAFORMA VISÍVEL): ACUIDADE VISUAL

A Figura 19 apresenta os períodos de latência média até a localização da plataforma visível no labirinto aquático de Morris em quatro tentativas, durante a infância e adolescência, das proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. A análise da latência indica que houve efeito estatístico para idade ($F_{1,80} = 101,48$; $p < 0,001$), além de interação estatística entre tratamento e idade ($F_{3,80} = 3,14$; $p < 0,05$).

Os filhotes expostos à infecção gestacional pelo ZIKV e com infecção prévia ao DENV-1 (DENV/ZIKV) apresentaram aumento estatisticamente significativo na latência média, quando comparados ao grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$) na infância. Já na adolescência, não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre os tratamentos, como mostra as Figuras 19A e 19B.

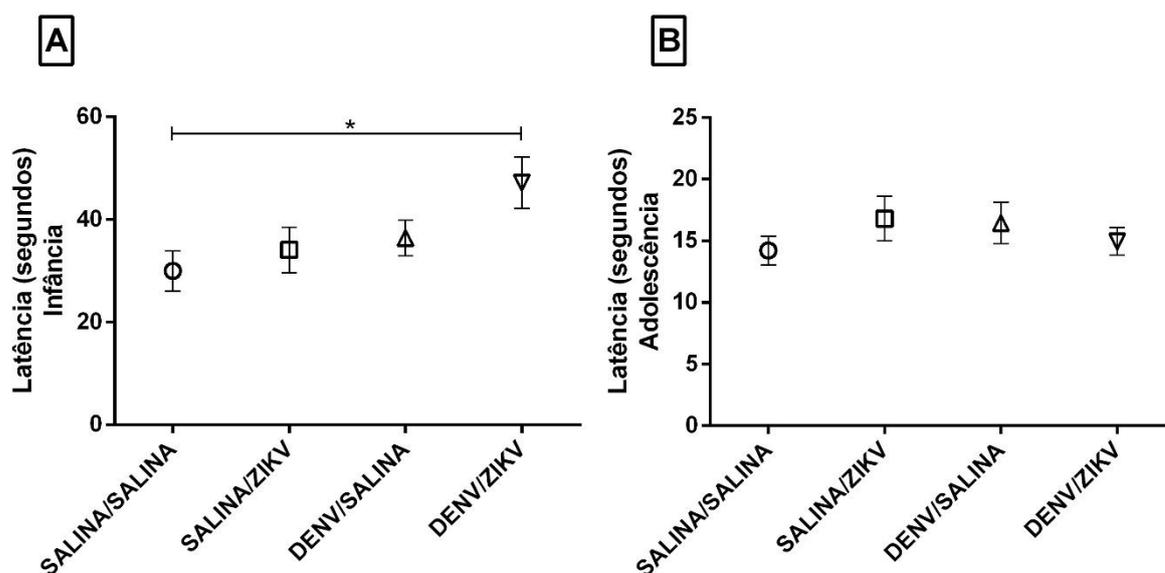


Figura 19 - Latência até a localização da plataforma sinalizada no labirinto aquático de Morris em quatro tentativas diárias durante a infância (PN20) e adolescência (PN42). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: $n=11$ /gênero por grupo experimental. Dados expressos em segundos \pm EPM. Teste ANOVA medidas repetidas, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$.

Fonte: da Autora

6.8 ENSAIO EM LABIRINTO AQUÁTICO DE MORRIS: MEMÓRIA DE REFERÊNCIA ESPACIAL

As figuras demonstradas a seguir ilustram os resultados obtidos durante as fases de treinamento e teste no labirinto aquático de Morris para avaliação da memória de referência espacial dos filhotes.

a) Treino

A Figura 20 apresenta os períodos de latência média, até a localização da plataforma submersa, durante o treino na adolescência para avaliar a aquisição da memória de referência espacial em labirinto aquático de Morris das proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. A análise da latência indica que houve efeito estatístico para tratamento ($F_{3,64} = 8,88$; $p < 0,001$) e para idade, representada pelos dias pós-natais, ($F_{4,256} = 128,76$; $p < 0,001$). Também houve interação estatística entre idade e gênero ($F_{4,256} = 2,80$; $p < 0,05$). Ainda, é importante ressaltar que não houve efeito estatístico para gênero, bem como não houve interação estatística entre tratamento e gênero, justificando a disposição gráfica dos dados sem divisão por gênero entre os grupos avaliados.

É possível observar que tanto em PN43 quanto em PN45, houve um aumento estatisticamente significativo nos valores de latência para localizar a plataforma submersa para os animais do grupo DENV/SALINA quando comparados aos animais do grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e aos animais do grupo DENV/ZIKV ($p < 0,05$).

Em PN44, animais SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) e animais DENV/SALINA ($p < 0,001$) apresentaram aumento estatisticamente significativo nos valores de latência quando comparados aos animais do grupo controle SALINA/SALINA, enquanto animais DENV/ZIKV apresentaram uma redução estatisticamente significativa nos valores de latência quando comparados aos animais do grupo DENV/SALINA ($p < 0,01$).

Em PN46, animais das proles SALINA/ZIKV ($p < 0,05$) e animais das proles DENV/SALINA ($p < 0,01$) apresentaram aumento estatisticamente significativo nos valores de latência quando comparados aos animais do grupo controle SALINA/SALINA e aos animais do grupo DENV/ZIKV.

Nenhuma diferença estatística entre os grupos foi observada em PN47.

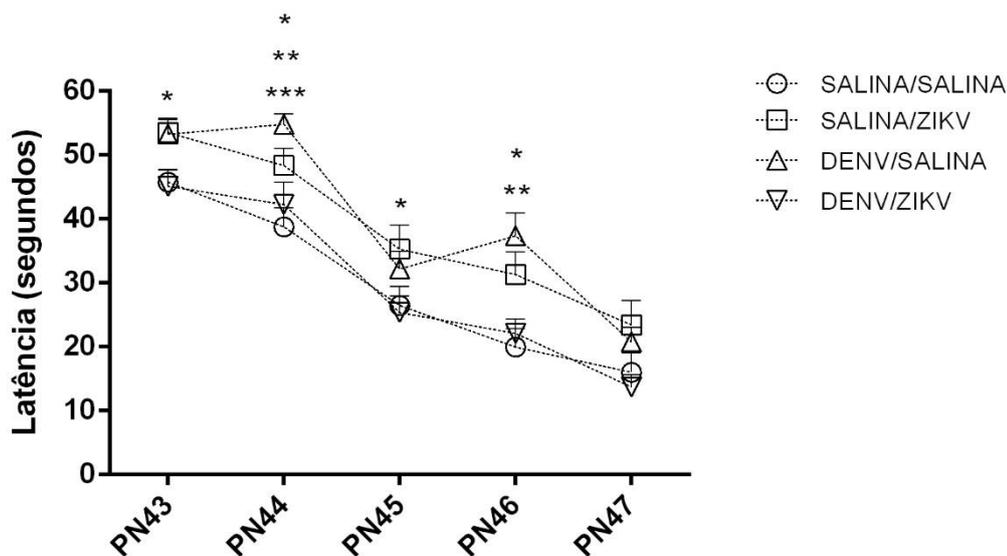


Figura 20 - Latência até a plataforma submersa, durante o treino para avaliar a memória de referência espacial no labirinto aquático de Morris na adolescência (PN43 – PN47). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: $n=9$ /gênero por grupo experimental. Dados expressos em segundos \pm EPM. Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$.

Fonte: da Autora

b) Teste

A Figura 21 apresenta os parâmetros obtidos no dia teste para avaliar a memória de referência espacial das proles de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. A análise dos dados obtidos indica que houve interação estatística apenas entre tratamento e gênero para a porcentagem de distância percorrida no quadrante alvo (Figura 21A) ($F_{3,64} = 4,16$; $p < 0,01$) e porcentagem de tempo no quadrante alvo (Figura 21C) ($F_{3,64}$

= 2,92; $p < 0,05$). Os demais parâmetros avaliados não apresentaram nenhum efeito ou interação estatística.

Como demonstrado na Figura 21A, camundongos fêmeas que apresentavam exposição prévia ao DENV-1 associada a infecção gestacional pelo ZIKV apresentaram aumento estatisticamente significativo na distância percorrida no quadrante alvo quando comparadas as fêmeas do grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,05$) e as fêmeas do grupo SALINA/ZIKV ($p < 0,01$). Ainda, camundongos fêmeas DENV/ZIKV apresentaram aumento estatisticamente significativo no tempo de permanência no quadrante alvo quando comparadas as fêmeas do grupo SALINA/ZIKV ($p < 0,01$), como demonstrado na Figura 21C.

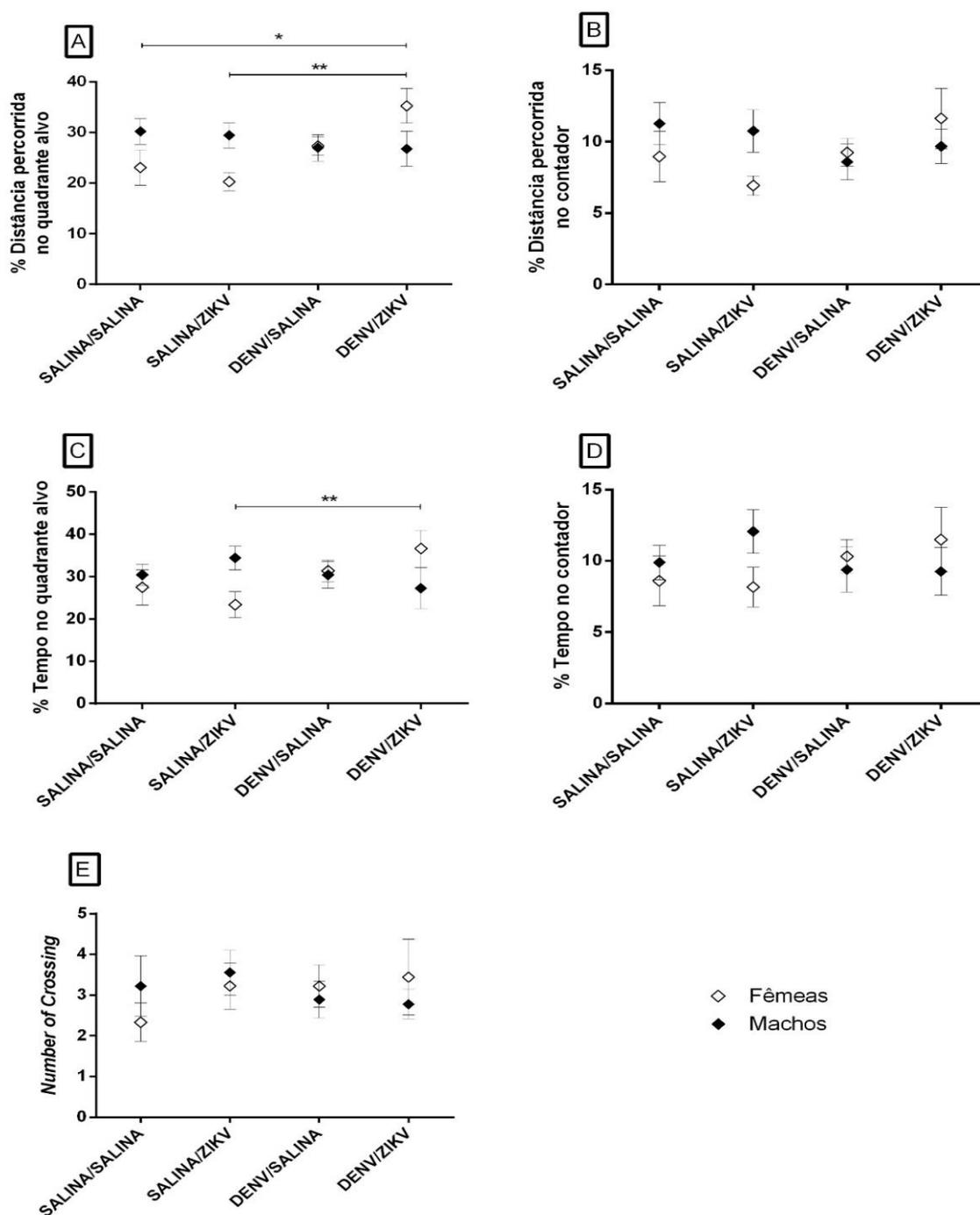


Figura 21 - Teste de memória de referência espacial em labirinto aquático de Morris na adolescência (PN48). Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: n=9/gênero por grupo experimental. A – Distância percorrida no quadrante alvo (porcentagem da distância percorrida no quadrante alvo em relação à distância total). B – Distância percorrida no contador (porcentagem da distância percorrida no contador em relação à distância total). C – Tempo no quadrante alvo (porcentagem de tempo de permanência no quadrante alvo em relação ao tempo total). D – Tempo no contador (porcentagem de tempo de permanência no contador em relação ao tempo total). E – Número de vezes que os animais atravessaram o local da plataforma (números absolutos). Dados expressos como média \pm EPM. Teste ANOVA, seguido pelo teste *Newman-Keuls post-hoc*. *p<0,05; **p<0,01.

Fonte: da Autora

6.9 QUANTIFICAÇÃO DE BDNF EM ESTRUTURAS ENCEFÁLICAS

A Figura 22 apresenta a concentração de BDNF no cerebelo, no estriado e no hipocampo durante a infância de filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1.

Como demonstrado, houve diminuição estatisticamente significativa da concentração de BDNF no cerebelo de animais SALINA/ZIKV e DENV/SALINA quando comparados aos animais do grupo controle SALINA/SALINA ($p < 0,01$). Animais dos grupos SALINA/ZIKV e DENV/ZIKV apresentaram diminuição estatisticamente significativa da concentração de BDNF no estriado quando comparados aos animais do grupo SALINA/SALINA ($p < 0,05$). Ainda, animais DENV/ZIKV demonstraram redução estatisticamente significativa da quantidade de BDNF no estriado quando comparados aos animais do grupo DENV/SALINA ($p < 0,05$). Nenhuma diferença estatística foi observada na quantificação de BDNF no hipocampo dos animais.

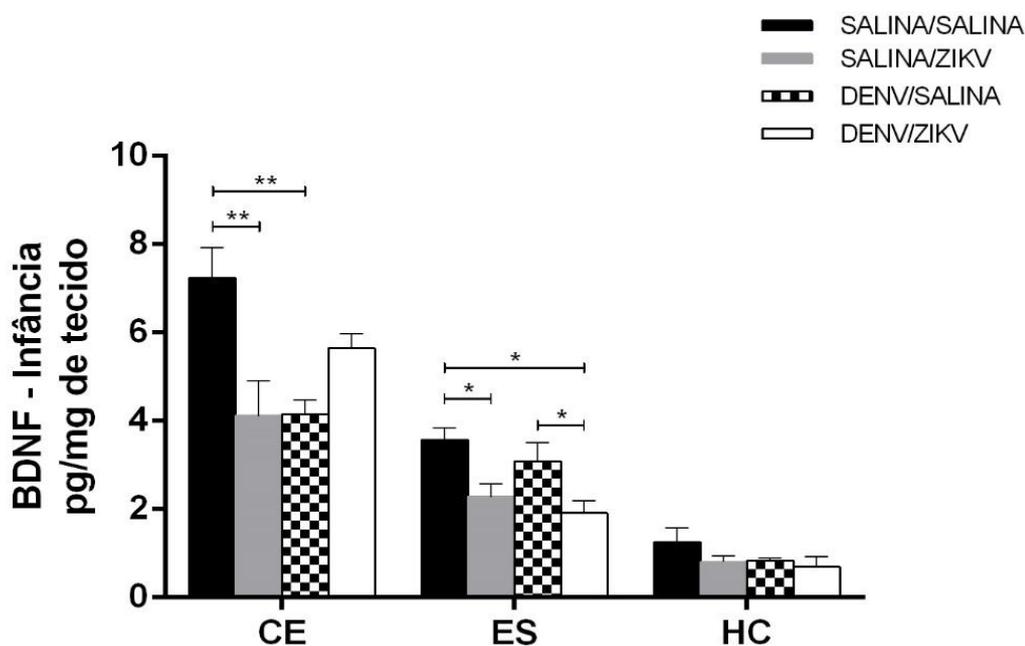


Figura 22 - Concentração de BDNF com kit BDNF Emax® ImmunoAssay System (Promega) no cerebelo (CE), estriado (ES) e hipocampo (HC) de animais na infância. Filhotes de camundongos expostos ou não ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem infecção prévia ao DENV-1. Número de animais: $n=5$ /estrutura por grupo experimental. Dados expressos em pg.mg^{-1} de tecido (média \pm EPM). Teste ANOVA uma via, seguido pelo teste *Newman-Keuls* post-hoc. * $p < 0,05$.

Fonte: da Autora

7 DISCUSSÃO

O presente estudo mostrou que proles oriundas de camundongos fêmeas submetidas a infecção gestacional pelo ZIKV associada à infecção prévia pelo DENV-1, apresentaram alterações, dependentes da idade e do gênero, no desenvolvimento, em parâmetros comportamentais como locomoção, ansiedade e memória, bem como na acuidade visual e nos níveis de BDNF no cerebelo e no estriado. Tais resultados foram observados mesmo com a ausência de partículas virais no encéfalo dos neonatos, sugerindo mecanismos indiretos da infecção gestacional pelo ZIKV em proles oriundas de camundongos fêmeas infectadas previamente pelo DENV-1.

No presente trabalho realizamos inoculações intravenosas, pela veia caudal, em camundongos Swiss fêmeas com DENV-1 e ZIKV, em momentos distintos. Nossos resultados indicam que fêmeas infectadas com ZIKV durante o período gestacional em um contexto de infecção prévia pelo DENV-1, apresentaram altos níveis de detecção de anticorpos IgG anti-ZIKV e anti-DENV-1, indicando que a presença de uma imunidade prévia para o DENV-1 provavelmente influenciou uma elevada produção de anticorpos de reatividade cruzada. De fato, estudos comprovam que o ZIKV possui uma estrutura organizacional muito semelhante ao DENV, incluindo o arranjo característico de homodímeros de proteína E na superfície do vírus (SIROHI et al., 2016; PRASAD et al., 2017). Além dessas semelhanças estruturais entre os dois arbovírus, os principais alvos para resposta humoral (anticorpos) nas infecções por DENV (proteínas E, prM e a NS1) compartilham considerável identidade sequencial de aminoácidos quando comparados aos do ZIKV (SIROHI et al., 2016; PRIYAMVADA et al., 2016b; STETTLER et al., 2016; YE et al., 2016). Essa relação estrutural e genética existente entre o ZIKV e o DENV sustenta a hipótese da reatividade cruzada entre seus respectivos anticorpos, uma característica que pode dificultar o diagnóstico preciso de pacientes e impactar as respostas imunológicas protetoras e patológicas relacionadas a essas infecções. Estudos clínicos utilizando soros de pacientes infectados com ZIKV e/ou DENV comprovaram essa reatividade cruzada (STETTLER et al., 2016).

As respostas de anticorpos anti-DENV e a outras infecções por *Flavivirus* também foram relacionadas à exacerbação da doença pelo ZIKV. A infecção de

células que expressam Fcγ-receptor (FcγR), na presença de anticorpos presentes em amostras de doadores com imunidade prévia a outro *Flavivirus*, mostraram aumentar de forma significativa a taxa de infecção pelo ZIKV. Este fenômeno, denominado como aumento dependente de anticorpos (ADA), ocorre por meio da reação cruzada entre anticorpos presentes em concentrações subneutralizantes, facilitando a entrada do vírus através de células permissivas, o que favorece a infecção. Ou seja, ao invés de inibir a infecção viral, esses complexos imunes resultantes de reação cruzada se ligam às células, sendo posteriormente internalizados de forma eficiente com a participação do FcγR (HALSTEAD, 2003).

Nesse contexto, estudos que confirmam a influência dos efeitos promovidos pela reação cruzada entre anticorpos anti-DENV e anti-ZIKV, colaboram para melhor compreensão das alterações observadas no desenvolvimento físico e reflexológico dos filhotes DENV/ZIKV no presente estudo. Estes animais apresentaram prejuízo, dependente de idade e gênero, no desenvolvimento corporal relacionado ao peso e comprimento e, em parâmetros físicos e/ou reflexológicos, demonstrando detecção precoce de parâmetros relacionados à descida dos testículos e perda da preensão palmar quando comparados ao grupo controle, bem como detecção tardia da orientação visual em relação aos demais grupos avaliados. O ADA proveniente da infecção pelo DENV foi demonstrado por outros grupos de pesquisa, que utilizaram como amostra soros e anticorpos monoclonais de pacientes com dengue primária e secundária. Ambos os anticorpos monoclonais neutralizantes e não neutralizantes aumentaram de forma significativa a infecção por DENV *in vitro*, enquanto a capacidade ADA de anticorpos induzidos por DENV também se estendeu para o ZIKV (BELTRAMELLO et al., 2010; SMITH et al., 2012; DEJNIRATTISAI et al., 2010; PRIYAMVADA et al., 2016a; PRIYAMVADA et al., 2016b; DEJNIRATTISAI et al., 2016). Estes trabalhos são de interesse sob uma perspectiva epidemiológica, já que a maior parte das regiões brasileiras que relataram casos de ZIKV também vivenciaram surtos de DENV.

Bardina et al (2017) mostraram pela primeira vez que ADA pode ocorrer *in vivo* durante a infecção por ZIKV em camundongos imunodeficientes. Os autores avaliaram os efeitos do plasma imune ao DENV e ao *West Nile virus* (WNV) frente infecção pelo ZIKV. Ambos os plasmas com imunidade prévia favoreceram a instalação do processo infeccioso pelo ZIKV no sangue dos animais, bem como na

medula espinhal e nos testículos. Após o terceiro dia da transmissão passiva, os títulos virais detectados no sangue de camundongos tratados com plasma imune de DENV foram maiores, quando comparados aos animais tratados com plasma imune de WNV, refletindo possivelmente um maior grau de reatividade cruzada entre anticorpos contra DENV e ZIKV. Apesar dos resultados experimentais obtidos serem claros, os autores relatam que é necessário confirmar se o fenômeno de ADA devido a infecção por flavivírus ou vacinação heteróloga prévia ocorre em humanos, considerando-se, principalmente, o contexto de ZIKV e gravidez.

Outro estudo, realizado por Castanha et al (2016) relatou que anticorpos específicos para DENV aumentaram substancialmente a instalação do processo infeccioso de uma cepa brasileira do ZIKV em uma linha celular K562, que expressava FcγRII. Os autores também observaram que as amostras de soro de mulheres grávidas com imunidade prévia ao DENV apresentaram esse mesmo comportamento frente a infecção pelo ZIKV.

No entanto, existem trabalhos que relataram possível efeito protetor contra a infecção pelo ZIKV, frente a imunidade prévia adquirida após infecção por DENV. Estudo em modelos murinos realizado por Wen et al (2017a) buscou determinar o impacto da imunidade prévia ao DENV sobre o resultado da infecção subsequente pelo ZIKV e identificar os componentes imunes responsáveis por tal influência, sendo que os resultados encontrados indicaram que a imunidade ao DENV, mediada por linfócitos TCD8⁺, reduziu significativamente a carga infecciosa de ZIKV em amostras de soros e tecidos. Esses resultados foram coerentes com outros trabalhos, os quais identificaram que células TCD8⁺ específicas para DENV conferiram proteção, em um contexto de infecções heterotípicas por outros sorotipos de DENV, mesmo com a presença do fenômeno de ADA (ZELLWEGER et al, 2015; ZELLWEGER et al, 2014).

Assim, até o momento permanece indefinido se a imunidade prévia ao DENV em humanos confere ação protetora ou patogênica contra a infecção pelo ZIKV. O número de estudos que demonstram a reatividade cruzada, em compartimentos humorais e celulares, contra DENV e ZIKV está crescendo. Embora muitos pesquisadores tenham explorado a reatividade cruzada de anticorpos entre DENV e ZIKV e, frente às alterações observadas no desenvolvimento nas proles DENV/ZIKV no presente estudo, o papel exato da imunidade humoral prévia ao DENV durante a infecção subsequente por ZIKV é incerto, assim, são necessários mais estudos sobre

o tema (STETTLER et al, 2016; PRIYAMVADA et al, 2016b; WEN et al, 2017b; DURBIN, 2016).

Ainda em relação às alterações nos parâmetros físicos e reflexológicos de animais DENV/ZIKV observadas em nosso estudo, sabe-se que para análise do desenvolvimento de roedores, os índices de sobrevivência neonatal, em conjunto com os pesos corporais e medidas de comprimento, são utilizados com o objetivo de medir distúrbios na salubridade pós-natal de animais, bem como o seu crescimento e desenvolvimento (HOOD, 2016). Estudo realizado por Cugola et al. (2016) mostrou que camundongos infectados pelo ZIKV durante o período gestacional apresentaram restrição de crescimento intrauterino refletido pela redução do desenvolvimento corporal dos filhotes infectados. Kawiecki et al. (2017) observaram lesões multifocais classificadas como leves a moderadas no encéfalo, medula espinhal e olhos de roedores fêmeas infectadas pelo ZIKV. Após eutanásia desses animais também foi observado a presença de infiltrado celular inflamatório no humor vítreo. Nos machos, o antígeno viral foi detectado no córtex cerebral, bem como nos órgãos reprodutores masculinos, os quais apresentaram epididimite necrossupurativa grave associada à presença abundante de ZIKV dentro do revestimento epididimal, em células germinativas dos túbulos seminíferos dos testículos e no fluido seminal dentro do lúmen do ducto deferente. Dessa forma, a descida precoce dos testículos em animais DENV/ZIKV observada no presente estudo possivelmente apresenta alguma relação com a detecção de partículas virais do ZIKV em tecidos reprodutores masculinos (KAWIECKI et al, 2017). Ainda, estudos em camundongos machos demonstraram uma replicação ativa de ZIKV em muitos tecidos genitais evidenciando uma alta patogenicidade do vírus, especialmente nos testículos e no epidídimo (CHAN et al, 2016; MA et al, 2016; ROSSI et al, 2016). No entanto, é importante ressaltar que nenhum caso clínico foi relatado até o momento. Assim, estudos adicionais são essenciais para uma melhor avaliação do impacto da infecção pelo ZIKV nos órgãos e em funções reprodutivas masculinas em seres humanos, identificando com precisão quais são as células mais infectadas, afetadas e que, eventualmente, podem transportar o ZIKV.

Ao contrário de Hughes et al (2016), que identificaram uma infecção persistente por ZIKV em cultura de tecidos neuronais imaturos, e Bhatnagar et al. (2017), que relataram resultados positivos para pesquisa de ZIKV em 62% das amostras de tecido

encefálico fetal com diagnóstico de microcefalia, bem como em tecidos placentários/fetal de 52 mulheres grávidas, nossos resultados demonstraram a ausência de partículas virais de ZIKV no encéfalo dos camundongos Swiss neonatos infectados verticalmente. No entanto, como demonstrado em estudos pré-clínicos realizados por Chan et al. (2016), a replicação viral e efeitos citopáticos (alterações morfológicas) pode ser identificada em outros tecidos, como as linhas celulares placentárias, hepáticas, retinianas, pulmonares e musculares. Os autores ainda observaram que a replicação de ZIKV, porém com ausência de efeitos citopáticos, em células renais, testiculares e próstata. Cugola et al. (2016) identificou a presença de RNA viral do ZIKV no fígado, baço e nos rins de camundongos infectados verticalmente. Nesse contexto, a presença de ZIKV em diferentes tecidos e órgãos também pode estar associada às alterações identificadas no presente estudo.

Estudo realizado por Braul et al. (2016) evidenciou que ZIKV apresenta tropismo para as células progenitoras neurais, prejudicando a progressão normal do ciclo celular, além de inibir a apoptose das células afetadas durante a fase inicial da infecção. Entretanto, a confirmação da presença viral em outros alvos celulares, mesmo que em menor número quando comparado a infecção no encéfalo, merece atenção tendo em vista os recentes achados relatando que o ZIKV pode causar outras alterações frente a infecção vertical, tais como postura anormal de membros, cegueira e deficiência visual, além de disfunção auditiva.

Em relação ao DENV, seus efeitos no SNC são mais conhecidos, apesar de até o momento não estar claro se esse vírus possui a capacidade de invadir o tecido nervoso de forma ativa ou se ele possui a habilidade de permear, passivamente, a BHE durante o curso da infecção sistêmica (LUM et al., 1996; HOMMEL et al., 1998; SOLOMON et al., 2000; PANCHAROEN; THISYAKORN, 2001; VASCONCELOS et al., 1998; YEO et al., 2005; WITAYATHANWORNWONG, 2005). A manifestação mais relatada é a consciência alterada, embora ainda não tenha sido elucidado se esse estado seja resultante de um desequilíbrio metabólico, dano tecidual mediado pela imunidade ou invasão viral direta no tecido nervoso. Alguns trabalhos isolaram, durante necropsia, antígenos virais do DENV no encéfalo de pacientes com dengue, enquanto outros estudos demonstraram, durante a fase aguda da doença, amplificação do RNA viral em amostras de líquido cefalorraquidiano (MIAGOSTOVITCH et al., 1997; RAMOS et al., 1998; SOLOMON et al., 2000).

O início do desenvolvimento do SNC é um processo complexo, caracterizado como um período de vulnerabilidade, que pode sofrer a influência de diversos fatores. Quaisquer perturbações na sequência de eventos normais podem acarretar efeitos irreversíveis na estrutura e função do tecido (MOURA-RIBEIRO; GONÇALVES, 2006; RICE; BARONE, 2000). A ocorrência de eventos adversos durante o período gestacional, que influenciam os processos críticos do desenvolvimento do SNC, podem predispor o feto a distúrbios cognitivos durante a idade adulta (BROWN, 2006). A infecção materna ganhou atenção significativa nos últimos anos devido à sua associação com vários distúrbios neurológicos (MEYER; FELDON; DAMMANN, 2011; BROWN; PATTERSON, 2011; MEYER; FELDON, 2012). De fato, a exposição fetal pela infecção vertical e pelos processos inflamatórios podem acarretar consequências a longo prazo, sendo os efeitos estudados principalmente durante a infância e a adolescência (JOHN; BLACK; NELSON, 2017). Desse modo, os ensaios comportamentais em roedores representam uma importante ferramenta experimental. A análise comportamental apresenta como objetivos principais identificar, descrever e programar relações condicionais que estabelecem e controlam a probabilidade de parâmetros comportamentais (BAUM, 1999). Entre os modelos comportamentais mais utilizados estão o campo aberto e o labirinto em cruz elevado. A avaliação do comportamento exploratório e atividade locomotora fundamenta-se na exposição do animal em um confinamento, por um determinado período de tempo, em ambiente totalmente inédito, ou seja, nunca experimentado antes pelo animal. Esse comportamento tem sido investigado principalmente pela atividade em campo aberto (ARCHER, 1973; CALABRESE, 2008).

Nesse contexto, nossos resultados demonstraram uma redução significativa na atividade locomotora (locomoção total) em filhotes de camundongos expostos ao ZIKV durante período gestacional, com ou sem imunidade prévia ao DENV-1, durante a infância. Porém, durante a adolescência, apenas filhotes fêmeas SALINA/ZIKV mantiveram essa redução na locomoção total, caracterizando uma possível reversão nos efeitos locomotores de animais DENV/ZIKV nessa idade. Nossos resultados estão parcialmente de acordo com estudo realizado por Cui et al. (2017), que avaliaram o comportamento de camundongos C57BL/6 imunocompetentes provenientes de uma infecção pela via intra-amniótica pelo ZIKV durante o período gestacional, analisando as alterações até a fase adulta desses animais. Os autores observaram déficit nas

funções motoras, sendo que muitas ninhadas infectadas pelo ZIKV começaram a apresentar alterações no 20º dia pós-natal. Esses dados foram comprovados a partir do teste Rota-rod, em que os animais infectados apresentaram uma redução significativa no tempo de permanência na barra rotativa. Além disso, o desempenho dos camundongos infectados não demonstrou melhora durante o treino em 3 dias, resultado oposto ao observado nos camundongos controle. Ainda, os autores relatam que dois animais exibiram paralisia dos membros posteriores e os caracterizaram com artrogripose, característica presente em alguns pacientes infectados pelo ZIKV (artrogripose presente nos braços e pernas de crianças infectadas) (van der LINDEN et al., 2016).

O presente estudo também demonstrou que filhotes dos grupos SALINA/ZIKV, DENV/SALINA e DENV/ZIKV apresentaram-se menos ansiosos em relação aos animais do grupo controle durante a infância, comportamento refletido pelo maior tempo de permanência nos braços abertos do labirinto em cruz elevado. Na adolescência, é possível observar que, apesar de serem menos ansiosos que os animais do grupo SALINA/SALINA, os animais DENV/ZIKV mostraram-se mais ansiosos que os filhotes DENV/SALINA e SALINA/ZIKV. Estes resultados sugerem que a associação da exposição ao ZIKV durante período gestacional com a imunidade prévia ao DENV-1 leva a comportamentos distintos dependendo da idade dos animais.

Esses mesmos filhotes SALINA/ZIKV, DENV/SALINA e DENV/ZIKV apresentaram redução na frequência e no tempo total do comportamento de *grooming* durante a infância e a adolescência, refletindo uma possível relação à redução da ansiedade observada no labirinto em cruz elevado. Caracterizado como um comportamento estereotipado inerente aos mamíferos, o *grooming* consiste em um padrão de movimentos relacionados à limpeza animal (SPRUIJT et al., 1992). Esse comportamento também está envolvido em outros processos fisiológicos importantes, incluindo interações sociais e sexuais, deslocamento e excitação (FERKIN; LEONARD, 2005; YU et al, 2010; KALUEFF; TUOHIMAA, 2005). Em roedores, o *grooming* é um dos comportamentos mais prevalentes (SPRUIJT et al., 1992; WELCH et al., 2007). Frente sua alta prevalência e natureza sequencialmente padronizada, a análise desse comportamento fornece aporte como uma ferramenta para avaliar os mecanismos neuronais subjacentes ao controle e aos comportamentos relativos à ansiedade e atividade motora. Diferentes áreas cerebrais, neuromoduladores e genes

estão envolvidos nesse comportamento de auto-limpeza (KALUEFF et al., 2016). O *grooming*, inclusive, mostrou-se experimentalmente manipulável, já que lesões, mutações genéticas e o estresse psicológico afetaram sua ocorrência. Dessa forma, nossos resultados estão de acordo com estudo que avaliou ratos submetidos a estresse induzido por contenção, os quais emitiram elevada frequência de *grooming*, sugerindo que esse tipo de comportamento está associado à recuperação após altos níveis de excitação (VELOSO et al, 2016). Visto que o *grooming* está relacionado ao estresse e à diminuição do estado excitado, fatores ambientais e estressores têm sido relacionados ao aumento desse padrão comportamental em roedores (KALUEFF et al., 2016). Assim, pode-se sugerir que as infecções, isoladas ou associadas, de DENV-1 e ZIKV promovem a redução da ansiedade nos animais avaliados, em relação aos animais controle.

Ao contrário de Cui et al. (2017), que não observaram alterações na ansiedade dos animais infectados pelo ZIKV, nossos resultados sugerem que a infecção pelo ZIKV no período gestacional, com imunidade prévia ao DENV-1, bem como as infecções isoladas, induz efeito ansiolítico durante a infância dos camundongos. Entretanto, durante a adolescência, a condição de infecção gestacional pelo ZIKV frente infecção prévia pelo DENV-1 induz efeito ansiogênico em relação as infecções isoladas.

Nosso trabalho também demonstrou que animais DENV/ZIKV apresentaram diminuição da acuidade visual na infância. Esse resultado foi observado pela detecção tardia da orientação visual desses filhotes e confirmado em ensaio realizado em labirinto aquático de Morris com plataforma visível. Porém, esse prejuízo na acuidade visual parece ser revertido na adolescência destes animais. Cui et al. (2017) também relatam uma possível redução na acuidade visual de animais infectados pelo ZIKV. No entanto, essa suspeita surgiu frente a observação da queda dos camundongos dos braços abertos durante o ensaio no labirinto em cruz elevado. Neste mesmo trabalho os animais apresentaram déficit na coordenação motora por meio do teste Rota-rod, o que pode contribuir para queda relatada. Contudo, as análises histológicas realizadas permitiram a identificação de alterações significativas, em diferentes idades, na retina dos animais infectados, como a ausência de laminação acompanhada por uma redução na espessura dessa estrutura durante a adolescência. O nervo óptico dos animais infectados já apresentava alterações

consideráveis durante a infância, sendo observada uma severa diminuição dessa estrutura nos filhotes com 12 dias de idade. Ainda, a relação causal entre a infecção pelo ZIKV e as alterações visuais também foi confirmada pela detecção de cópias de RNA viral nos olhos dos animais infectados com 8 dias de idade.

Segundo estudos clínicos realizados por Szejnfeld et al (2016), foram relatados casos em que neonatos nascidos em regiões de grande incidência do ZIKV, não apresentaram malformação encefálica de forma evidente, ou seja, possuíam perímetro encefálico caracterizado como normal, sem alterações físicas. Segundo a pesquisa, essa ausência de malformação encefálica poderia estar correlacionada a uma das alterações promovidas pelo vírus no feto, a ventriculomegalia, em que os ventrículos cerebrais apresentam-se maiores que o normal. No entanto, esses recém-nascidos manifestaram outras complicações relacionadas à infecção, tais como problemas na visão, envolvendo inclusive a malformação do globo ocular (VENTURA et al, 2016). Cabe destacar que a visão constitui uma importante função no desenvolvimento do ser humano, pois estimula e direciona ações e movimentos. Os comportamentos referentes ao ato de olhar, fixar e seguir visualmente um objeto são fundamentais e caracterizados como os primeiros indicadores de atividade da região cortical (FIAMENGHI, 2000). Alterações e condições nocivas promovidas por agentes externos durante o período crítico de desenvolvimento do SNC podem promover diminuição ou perda da capacidade visual, bem como alterações nas vias neurológicas da visão (HEINICKE, 1984).

Para os resultados relativos ao desenvolvimento de memória de referência espacial obtidos no presente estudo, foi possível observar que, ao longo do treino, animais DENV/ZIKV apresentaram diminuição nos valores de latência para localização da plataforma submersa, refletindo uma melhora na aquisição da memória espacial quando comparados aos animais SALINA/ZIKV e DENV/SAL. Durante o teste, foi possível observar que, em camundongos fêmeas, a infecção gestacional pelo ZIKV associada a infecção prévia pelo DENV-1 induziu aumento no tempo de permanência e da distância percorrida no quadrante alvo em relação as fêmeas do grupo SALINA/ZIKV.

Nossos dados são, em parte, condizentes com os resultados observados por Ferreira et al (2017), que avaliaram a memória de referência espacial em camundongos Swiss neonatos infectados com ZIKV, no terceiro dia de vida, e tratados

com sofosbuvir, um fármaco pertencente à classe dos antivirais e utilizado no tratamento da infecção por hepatite C crônica em adultos. Os animais que sobreviveram a infecção pelo ZIKV, com idade entre 6 a 8 semanas, foram submetidos ao teste comportamental em labirinto aquático de Morris. Durante as sessões de treino, não foram observadas diferenças nos valores de latência para encontrar a plataforma submersa entre os grupos saudável, infectado e o infectado-tratado. Entretanto, durante o dia teste, filhotes infectados pelo ZIKV e não tratados permaneceram menos tempo no quadrante alvo quando comparados aos demais grupos avaliados. Ainda, camundongos infectados e não-tratados demonstraram prejuízo considerável no reflexo neuromotor mensurado (endireitamento postural). Esses resultados são consistentes com trabalhos que demonstraram morte celular e inflamação cerebral, em áreas relacionadas a formação da memória, induzida pelo ZIKV (ONORATI et al, 2016; van den POL et al, 2017; HUANG et al, 2016).

Os avanços recentes nas metodologias de detecção de organismos infecciosos que podem afetar o sistema nervoso possibilitaram a constatação de que uma fração significativa das doenças que afetam funções neurológicas, cognitivas e comportamentais pode realmente ter uma origem aguda e passível de prevenção (JOHN et al., 2015). No entanto, algumas infecções virais podem representar um fator complicador para o desenvolvimento adequado do SNC, podendo desencadear respostas imunológicas no tecido nervoso. Tal resposta está relacionada a virulência do patógeno e pode levar a neurodegeneração e apoptose no SNC (AMOR et al., 2010; CZIRR; WYSS-CORAY, 2012).

O desenvolvimento e refinamento do SNC são regulados por sinais parácrinos e endócrinos. Fatores neurotróficos como o BDNF, são cruciais durante essas fases. Esses processos ocorrem também no encéfalo maduro, durante o período pós-natal, porém em menor proporção (URBAN; GUILLEMOT, 2014). Nossos resultados demonstraram que a infecção prévia ao DENV-1 com subsequente infecção pelo ZIKV durante o período gestacional, não induziu alteração nos níveis de BDNF no cerebelo e no hipocampo das proles, durante a infância. Porém, foi observada uma diminuição considerável nos níveis desse fator neurotrófico no cerebelo de animais SALINA/ZIKV e DENV/SALINA, quando comparados aos animais do grupo controle. Para a quantificação de BDNF no estriado foi observado uma redução significativa para animais SALINA/ZIKV e DENV/ZIKV em relação ao grupo controle. Ainda, animais

DENV/ZIKV também apresentaram níveis menores de BDNF no estriado quando comparados aos filhotes DENV/SALINA.

Mesmo que o hipocampo seja definido como a principal estrutura responsável pela aprendizagem espacial e pela memória, existem evidências de que o cerebelo também possa estar associado a alterações comportamentais relacionadas. Uma revisão sistemática de trabalhos que analisaram imagens estruturais do encéfalo de pacientes com transtorno de déficit de atenção com hiperatividade demonstrou a presença de anormalidades no volume do cerebelo, como redução em áreas do cerebelo posterior (VALERA et al., 2007). Dessa maneira, nossos resultados sugerem que animais DENV/ZIKV apresentam níveis semelhantes de BDNF no cerebelo quando comparados aos animais SALINA/SALINA, sendo que este dado pode estar correlacionado ao resultado obtido no teste de memória em labirinto aquático de Morris, em que fêmeas DENV/ZIKV apresentaram melhora na aquisição de memória de referência espacial comparadas às fêmeas SALINA/ZIKV.

Trabalho realizado por Diamond (2000) relata que o desenvolvimento motor e cognitivo são associados e compartilham um percurso temporal prolongado e semelhante. A existência de um transtorno neurológico que afeta o desenvolvimento cognitivo, apresenta uma considerável probabilidade de prejudicar o desenvolvimento motor também. Nesse contexto, nossos resultados demonstraram, principalmente, redução nos níveis de BDNF no estriado de filhotes SALINA/ZIKV e DENV/ZIKV, corroborando com os resultados identificados no teste de campo aberto realizado em nosso estudo, em que esses mesmos animais apresentaram comportamento de hipolocomoção durante a infância. De modo geral, nosso trabalho, suporta a hipótese de que tanto as infecções isoladas quanto o tratamento DENV/ZIKV induzem, de formas distintas, alterações no desenvolvimento de estruturas encefálicas críticas para a atividade locomotora, como o cerebelo e o estriado.

Ainda, nossos resultados estão em concordância com trabalhos realizados por Linares et al (2013) e Comim et al (2012), que mostraram que, em modelo murino, a infecção por malária cerebral leva a diminuição progressiva nos níveis de BDNF em diferentes regiões cerebrais, tais como: tálamo, hipotálamo, cerebelo, tronco cerebral e córtex, sugerindo que infecções que afetam o SNC podem induzir alterações bioquímicas significativas no tecido.

Em resumo, este é o primeiro estudo que avalia alterações no desenvolvimento da prole de camundongos infectados durante o período gestacional pelo ZIKV, associada a infecção prévia pelo DENV-1, por meio de ensaios comportamentais e bioquímico, adotando camundongos Swiss heterogênicos imunocompetentes como modelo experimental em um contexto de infecção vertical. Em conjunto e, mesmo com a ausência de partículas virais de ZIKV no encéfalo dos neonatos, nossos resultados suportam a hipótese de que a infecção pelo ZIKV durante o período gestacional, associada à infecção prévia pelo DENV-1, promove alterações significativas no desenvolvimento normal, a curto e longo prazo, das proles oriundas dos tratamentos, tendo em vista que, uma diminuição tardia no ganho de peso, alteração na detecção de parâmetros físicos e reflexológicos, prejuízo na atividade locomotora, diminuição da ansiedade, melhora nos processos de aprendizado e memória e diminuição dos níveis de BDNF no estriado foram observados, sendo que algumas dessas alterações mostraram-se dependentes da idade e do gênero dos animais.

8 CONCLUSÕES

Nosso trabalho sugere que:

- a) Camundongos fêmeas infectadas com ZIKV durante o período gestacional em um contexto de infecção prévia pelo DENV-1, possuem altos níveis de anticorpos IgG anti-ZIKV e anti-DENV-1, indicando que a presença de uma imunidade prévia para o DENV-1 eleva a produção de anticorpos de reatividade cruzada;
- b) Camundongos neonatos Swiss imunocompetentes provenientes de uma infecção vertical pelo ZIKV, associado a infecção prévia pelo DENV-1, não apresentam RNA viral do ZIKV em tecido encefálico, indicando que as alterações encontradas no desenvolvimento das proles podem estar associadas a presença do vírus em outros tecidos;
- c) A infecção gestacional pelo ZIKV, em animais com infectados previamente pelo DENV-1, leva a diminuição no ganho de peso e no comprimento, especialmente em fêmeas, em diferentes idades;
- d) A infecção gestacional pelo ZIKV frente a uma infecção prévia pelo DENV-1, induziu a descida precoce dos testículos comparado aos demais grupos, bem como a detecção precoce do parâmetro relacionado à perda da preensão palmar nesses filhotes, quando comparados aos animais do grupo controle. Esses mesmos animais apresentaram desenvolvimento tardio da orientação visual, quando comparados aos demais grupos. Ainda, filhotes machos DENV/SALINA apresentaram separação precoce do prepúcio, quando comparados aos machos SALINA/ZIKV e, filhotes fêmeas DENV/SALINA apresentaram abertura precoce do canal vaginal, quando comparadas as fêmeas dos demais tratamentos;

- e) Filhotes de camundongos infectados pelo ZIKV durante período gestacional, previamente expostos à infecção pelo DENV-1, apresentaram prejuízo na atividade locomotora durante a infância. Durante a adolescência, apenas fêmeas do grupo SALINA/ZIKV apresentaram prejuízo locomotor;
- f) A infecção gestacional pelo ZIKV frente uma imunidade prévia DENV-1 induziu diminuição da ansiedade na infância da prole. O mesmo efeito foi observado na adolescência dos animais DENV/ZIKV em relação aos grupos SALINA/ZIKV e DENV/SAL. Ainda, resultados relacionados ao padrão de *grooming* corroboram com os resultados relativos à diminuição da ansiedade observada nesses mesmos animais;
- g) Filhotes de camundongos expostos ao ZIKV durante período gestacional e previamente infectados pelo DENV-1, apresentaram prejuízo na acuidade visual na infância, sendo que este efeito foi revertido na adolescência;
- h) Filhotes DENV/ZIKV apresentaram melhora na aquisição da memória de referência espacial em relação aos animais SALINA/ZIKV;
- i) Durante a infância, filhotes DENV/ZIKV apresentaram uma diminuição nos níveis de BDNF no estriado. Ainda, filhotes SALINA/ZIKV apresentaram redução nos níveis de BDNF no cerebelo e no estriado quando comparados aos animais do grupo controle SALINA/SALINA. Filhotes DENV/SALINA apresentaram diminuição nos níveis de BDNF no cerebelo em relação aos animais do grupo controle e, aumento nos níveis de BDNF no estriado, quando comparados aos animais DENV/ZIKV.

REFERÊNCIAS

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. **Arch Pathol Lab Med.**, v.141: p.26-32, 2017.

AMOR, S., et al. Inflammation in neurodegenerative diseases. **Immunology**, v.129, p.154–169, 2010.

ANDREOLLO, N. A.; SANTOS, E. F.; ARAÚJO, M. R.; LOPES, L. R. Rat's age versus human's age: what is the relationship? **ABCD Arq. Bras. Cir. Dig.**, v.25, p.49-51, 2012.

ARAGÃO, M. F. V. et al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **BMJ**, v.13, p.353, abr. 2016.

ARCHER, J. Tests for emotionality in rats and mice: review. **Animal Behavior**, v.21, n.2, p.205-235, 1973.

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

BAUM, W.M. **Comprender o behaviorismo: ciência, comportamento e cultura.** Porto Alegre: Artes Médicas, 1999, p. 290.

BAYER, S. et al. Timetables of neurogenesis in the human brain based on experimentally determined patterns in the rat. **Neurotoxicology**, v.14, n.1, p.83–144, 1993.

BAYER, S.A. Development of the hippocampal region in the rat. II. Morphogenesis during embryonic and early postnatal life. **Journal of Comparative Neurology**, v.190, n.1, p.115–134, 1980.

BEAR, M.; CONNORS, B.; PARADISO, M. **Neurociências: desvendando o sistema nervoso.** 3.ed. Porto Alegre: Artmed, 2008, p. 896.

BELTRAMELLO, M., et al. The human immune response to Dengue virus is dominated by highly cross-reactive antibodies endowed with neutralizing and enhancing activity. **Cell Host Microbe.**, v.8, p.271–283, 2010.

BERRY, R. B.; MATTHEWS, D.B. Acute ethanol administration selectively impairs spatial memory in C57BL/6J mice. **Alcohol**, v.32, n.1, p.9–18, 2004.

BESNARD, M. et al. Evidence of perinatal transmission of zika virus, french polynesia, december 2013 and february 2014. **EuroSurveillance**, v.19, abr. 2014.

BHATNAGAR, J., et al. Zika virus RNA replication and persistence in brain and placental tissue. **Emerg Infect Dis.**, v.23, p.405-14, 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da saúde. **Evento de saúde pública relacionado aos casos de Febre Zika**. 2016d. Disponível em: <portalsaude.gov.br/index.php/orientacoes-zika>. Acesso em: 01 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Portal da saúde. **Febre do Zika Virus – Distribuição Mundial**. 2016e. Disponível em; <portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 17 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de atenção à saúde. **Protocolo de Atenção à saúde e resposta a ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo Zika virus**. 2015. Disponível em: <portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 01 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**. 2016a. Disponível em: <portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 02 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Boletim Epidemiológico**, v.48, n.2, 2017a. Disponível em: <http://portalsaude.saude.gov.br/images/pdf/2017/janeiro/12/2017_001%20-%20Dengue%20SE51_publicacao.pdf>. Acesso em: 17 jan. 2017.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico nº 24 – Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil**. 2016b. Disponível em; <portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 01 mai. 2016.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. **Informe Epidemiológico nº 57 – Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil.** 2017b. Disponível em; <portalsaude.saude.gov.br>. Acesso em: 17 jan. 2017.

BRASIL. Portal Brasil. **Especialistas tiram dúvidas sobre Zika e microcefalia.** 2016c. Disponível em: <www.brasil.gov.br/saude>. Acesso em: 01 maio 2016.

BRAUL, T. J. B., et al. Comparative analysis between flaviviruses reveals specific neural stem cell tropism for zika virus in the mouse developing neocortex. **EBioMedicine**, v. 10, p.71-6, 2016.

BROADHURST, P. L. The place of animal psychology in the development of psychosomatic research. **Fortschr. Psychosom. Med.**, v.1, p.63-69, 1960.

BRONFRENBERNER, U. Toward an experimental ecology of human development. **Am. Psychol.**, v.52, p.513-531, 1977.

BROWN, A. S. Prenatal infection as a risk factor for schizophrenia. **Schizophr Bull.**, v.32, p.200–202, 2006.

BROWN, A. S., PATTERSON, P. H. Maternal infection and schizophrenia: implications for prevention. **Schizophr Bull.**, v.37, p.284–290, 2011.

CALVET, G., et al. Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. **Lancet Infect Dis.**, v.16, p.653-60, 2016.

CAO-LORMEAU, V. M. et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus, French Polynesia - South pacific. **Emerg Infect Dis.**, v.20, p.1085-6, 2014.

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

CARVALHO, S. E. S. et al. Comparative analysis of American Dengue virus type 1 full-genome sequences. **Virus Genes**, v.40, n.1, 2010

CASTANHA, P. M., et al. Dengue virus (DENV) -specific antibodies enhance Brazilian Zika virus (ZIKV) infection. **Journal of Infectious Diseases**, v.29, p.781-785, 2016.

CHAN, J. F., et al. Differential cell linesusceptibility to the emerging Zika virus: implicationsfor disease pathogenesis, non-vector-bornehuman transmission and animal reservoirs. **Emerg Microbes Infect.**, v.5, p.93, 2016.

CLANCY, B.; CHARVET, C.J.; DARLINGTON, R.B.; FINLAY, B.L.; WORKMAN, A. **Translating time**. Disponível em: <<http://translatingtime.net/home>>. Acesso em: 3 jul. 2017.

COMIM, C. M. et al. Effects of experimental cerebral malaria in memory, brain-derived neurotrophic factor and acetylcholinesterase activity [correction for acitivity] in the hippocampus of survivor mice. **Neurosci. Lett.**, v.523, p.104–107, 2012.

CRUZ, A.P.M.; ZAGROSSI Jr., H.; GRAEFF, F.G.; LANDEIRA-FERNANDEZ, J. Modelos animais de ansiedade: implicações para a seleção de drogas ansiolíticas. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v.13, n.3, p.269–278, 1997.

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

CUI, L., et al. Visual and Motor Deficits in Grown-up Mice with Congenital Zika Virus Infection. **Ebiomedicine**, v.20, p.193-201, 2017.

CZIRR, E., WYSS-CORAY, T. The immunology of neurodegeneration. **J. Clin. Invest.**, v.122, p.1156–1163, 2012.

DEJNIRATTISAI, W., et al. Cross-reacting antibodies enhance dengue virus infection in humans. **Science**, v.328, p.745–748, 2010.

DEJNIRATTISAI, W., et al. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. **Nat Immunol.**, v.17, p.1102–1108, 2016.

DIAMOND, A. Close interrelation of motor development and cognitive development and of the cerebellum and prefrontal cortex. **Child Development**, v.71, n.1, p.44–56, 2000.

DICK, G. W.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus II. Pathogenicity and physical properties. **Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.** v.46, p.509–520, 1952.

DOBBING, J. The later development of the brain and its vulnerability. In: DAVIS, J.; DOBBING, J., eds. **Scientific foundations of paediatrics**. 2.ed. London, Baltimore: Heinemann, p.744–759, 1982.

DORETTO, S. et al. Oligodendrocytes as regulators of neuronal networks during early postnatal development. **PloS One**, v.6, n.5, 2011.

DRUMOND, B. P., et al. Population dynamics of DENV-1 genotype V in Brazil is characterized by co-circulation and strain/lineage replacement. **Archives of Virology**, v.157, n.11, p.2061-2073, 2012.

DURBIN, A. P. Dengue antibody and Zika: friend or foe? **Trends Immunol.**, v.37, p.635–636, 2016.

DWYER, J.B.; BROIDE, R.S.; LESLIE, F.M. Nicotine and brain development. **Birth Defects Research, Part C: Embryo Today - Reviews**, v.84, n.1, p.30–44, 2008.

DWYER, J.B.; MCQUOWN, S.C.; LESLIE, F.M. The dynamic effects of nicotine on the developing brain. **Pharmacology & Therapeutics**, v.122, n.2, p.125–139, 2009.

EHRlich, I. et al. PSD-95 is required for activity-driven synapse stabilization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 10, p. 4176-81, 6 mar. 2007.

EHRlich, I.; MALINOW, R. Postsynaptic density 95 controls AMPA receptor incorporation during long-term potentiation and experience-driven synaptic plasticity. **The Journal of Neuroscience**, v. 24, n. 4, p. 916-27, 2004.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). **Epidemiological update:** Outbreaks of Zika virus and complications potentially linked to the Zika virus infection. 2016. Disponível em: <ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-microcephaly-Brazil-rapid-risk-assessment-Nov-2015.pdf>. Acesso em: 30 abr. 2016.

EVANS, A. E. et al. Molecular Regulation of Striatal Development: A Review. **Anatomy Research International**, [s.l.], v. 2012, p.1-14, 2012.

FARIA, N. R. et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, New York, v.352, p. 345-349, mar. 2016.

FAYE, O. et al. Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught mosquitoes. **Virology**, v.10, n.311, out. 2013.

FENTRESS, J.C.; STANFIELD, B.B.; COWAN, W.M. Observation on the development of the striatum in mice and rats. **Anatomy and Embryology**, v.163, n.3, p.275–298, 1981.

FERKIN, M. H., LEONARD, S. T. Self-grooming by rodents in social and sexual contexts. **Acta Zool Sin.**, p.772–9, 2005.

FERNANDES, N. C., et al. Experimental Zika virus infection induces spinal cord injury and encephalitis in newborn Swiss mice. **Experimental and Toxicologic Pathology**, [s.l.], v. 69, n. 2, p.63-71, 2017.

FERNÁNDEZ, M. et al. A single prenatal exposure to the endocrine disruptor 2,3,7,8-tetrachlorodibenzo-p-dioxin alters developmental myelination and remyelination potential in the rat brain. **Journal of Neurochemistry**, v.115, n.4, p.897–909, 2010.

FERREIRA, A. C. et al. Sofosbuvir protects Zika virus-infected mice from mortality, preventing short- and long-term sequelae. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p.1-9, 2017.

FERREIRA, L.T. **Sinais de tráfego envolvidos no endereçamento do Transportador Vesicular de Acetilcolina (VACHT)**. 137f. Tese (Doutorado-Instituto de Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte; 2006.

FIAMENGHI, G. A. Interações com o espelho: uma análise segundo a teoria da intersubjetividade. **Temas sobre Desenvolvimento**, v.9, p. 10-18, 2000.

FIGUEIREDO, L. T. M. The Brazilian Flaviruses. **Microbes and Infection**, v.2, n.13, 2000.

FIOCRUZ/INSTITUTO OSWALDO CRUZ. **Dengue: vírus e vetor**. 2017. Disponível em: <<http://www.ioc.fiocruz.br/dengue/index.html>>. Acesso em: 19 jan. 2017.

FISCHER, M.; STAPLES, J. E. Arboviral Diseases Branch - **National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases, CDC**. Notes from the field: chikungunya virus spreads in the Americas—Caribbean and South America, 2013–2014. *Morb. Mortal Wkly. Rep.* v.63, n.22, p.500-1, 2014.

FORSHEY, B. M. et al. Arboviral etiologies of acute febrile illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLoS Negl Trop Dis.** v.4, n.8, 2010.

FRANÇA, G. V., et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. **The Lancet.**, v.388, n.10047, p.891-897, 2016.

GIMENES Jr., J.A. **Busca alimentar, memória espacial e ansiedade em ratos: possível participação do núcleo mamilar medial**. 163p. Dissertação (Mestrado - Instituto de Biociências) - Universidade de São Paulo, São Paulo; 2008.

HALSTEAD, S. B. Neutralization and antibody-dependent enhancement of dengue viruses. **Adv Virus Res.**, v.60, p.421–467, 2003.

HEINICKE, C. M. Impact of prebirth parente personality and marital functioning on Family development: a framework and suggestions for further study. **Dev, Psychol.**, v.20, p.1044-1453, 1984.

HOMMEL, D., et al. Dengue encephalitis in French Guiana. **Res Virol.**, v.149, p.235–8, 1998.

HOOD, R. D. **Developmental and Reproductive Toxicology: A Practical Approach**. 3 ed. United States of America: CRC Press, 2016.

HUANG, W. C. et al. Zika virus infection during the period of maximal brain growth causes microcephaly and corticospinal neuron apoptosis in wild type mice. **Sci. Rep.**, v.6, p.34793, 2016.

HUGHES, B. W., et al. Infectivity of immature neurons to Zika virus: a link to congenital Zika syndrome. **EBioMedicine**, v.10, p.65-70, 2016.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Med. Mal. Infect.**, v.44, p.302–307, 2014.

JOHN, C. C.; BLACK, M. M.; NELSON, C. A. Neurodevelopment: The Impact of Nutrition and Inflammation During Early to Middle Childhood in Low-Resource Settings. **Pediatrics**, v.139, n.1, p.59-71, 2017.

JOHN, C. C. et al. Global research priorities for infections that affect the nervous system. **Nature**, v.527, n.7578, p.178-186, 2015.

KALUEFF, A. V, TUOHIMAA, P. The grooming analysis algorithm discriminates between different levels of anxiety in rats: potential utility for neurobehavioural stress research. **J. Neurosci. Methods**, v.143, p.169-77, 2005.

KANTOR, I. N. Dengue, Zika y Chikungunya. **Medicina**, Buenos Aires, v.76, n.2, 2016.

KAWIECKI, A. B., et al. Tissue tropisms, infection kinetics, histologic lesions, and antibody response of the MR766 strain of Zika virus in a murine model. **Virology Journal**, v.14, n.1, 2017.

KIM, J. et al. Presynaptic activation of silent synapses and growth of new synapses contribute to intermediate and long-term facilitation in Aplysia. **Neuron**, v.40, n.1, p.151–165, 2003.

KOLB, B.; WHISHAW, I. Q. **Neurociência do comportamento**. Barueri: Manole, 2002.

LAEMMLI, U. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, n.5259, p.680–685, 1970.

LANCIOTTI, R. S. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic. **Emerg Infect Dis.**, Micronesia, v.14, n.8, p.1232-9, 2007.

JOHNSON, A. J. et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic. **Emerg Infect Dis.**, Micronesia, v.14, n.8, p.1232-9, 2007.

LANG, U.E. et al. Association of the met66 allele of brain-derived neurotrophic factor (BDNF) with smoking. **Psychopharmacology**, v.190, n.4, p.433–439, 2007.

LEAL, M. C. et al. Sensorineural hearing loss in a case of congenital Zika virus. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 2016.

LI, C., et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell Stem Cell**, v.19, p.672, 2016a.

LI, H., et al. Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. **Cell Stem Cell**, v.19, p.593–598, 2016b.

LI, X. F. et al. Characterization of a 2016 clinical isolate of Zika virus in non-human primates. **EBioMedicine**, v.12, p.170–177, 2016.

LINARES, M. et al. Brain-derived neurotrophic factor and the course of experimental cerebral malaria. **Brain Res.**, v.1490, p.210–224, 2013.

LINDENBACH, B. D.; RICE, C. M. Molecular biology of flaviviruses. **Adv. Virus Res.**, v.59, p. 23–61, 2003.

LUM, L. C. S. et al. Dengue encephalitis: a true entity? **Am J Trop Med Hyg.**, v.54, p.256–9, 1996.

MA, W. et al. Zika Virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. **Cell**, v.167, p.1511-1524, 2016.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Rev Soc Bras Med Trop.**, 2015.

MARTINES, R. B., et al. Notes from the Field: Evidence of Zika virus infection in brain and placental tissues from two congenitally infected newborns and two fetal losses - Brazil, 2015. **Morb. Mortal Wkly. Rep.**, v.65, p.159-60, 2016.

MARTINS, A. P. **Efeitos neurocomportamentais do fipronil administrado em dose única a ratos**. 85p. Dissertação (Mestrado – Faculdade de Medicina Veterinária e Zootecnia) - Universidade de São Paulo, São Paulo; 2009.

MCGRATH, E. L., et al. Differential responses of human fetal brain neural stem cells to Zika virus infection. **Stem Cell Reports**, v.8, p.715-27, 2017.

MEYER, U.; FELDON, J. To poly(I:C) or not topoly(I:C): advancing preclinical schizophrenia research through the use of prenatal immune activation models. **Neuropharmacology**, v.62, p.1308–1321, 2012.

MEYER, U.; FELDON, J.; DAMMANN, O. Schizophrenia and autism: both shared and disorder specific pathogenesis via perinatal inflammation? **Pediatr Res.**, v.69, p.26R–33R, 2011.

MIAGOSTOVITCH, M. P., et al. Retrospective study on dengue fatal cases. **Clin Neuropathol.**, v.16, p.204–8, 1997.

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

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal Of Virology**, v.91, n.8, p.9-17, 2017.

MOURA-RIBEIRO, M.V.L.; GONÇALVES, V. eds **Neurologia do desenvolvimento da criança**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006.

MOURÃO, M. P. et al. Arboviral diseases in the Western Brazilian Amazon: a perspective and analysis from a tertiary health & research center in Manaus, State of Amazonas. **Rev Soc Bras Med Trop**. v.48, n.1, p.20–6, 2015.

MULLANY, P.M.; LYNCH, M.A. Evidence for a role for synaptophysin in expression of long-term potentiation in rat dentate gyrus. **Neuroreport**, v.9, n.11, p.2489–2494, 1998.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? **Lancet.**, v.18, n.386, p.243-4, jul. 2015.

MYSOREKAR, I. U.; DIAMOND, M. S. Modeling Zika virus infection in pregnancy. **N Engl J Med.**, v.375, p.481–484, 2016.

NORTON, S. Methods for behavioral toxicology. In: HAYES, A. W., ed. **Principles and methods of toxicology**. 2 ed. New York, p.553-571, 1989.

O'KEEFE, J.; NADEL, L. **The hippocampus as a cognitive map**. Oxford: Oxford University Press, 1978, p. 570.

ONORATI, M. et al. Zika virus disrupts phospho-TBK1 localization and mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. **Cell Rep.**, v.16, p.2576–2592, 2016.

ORGANIZAÇÃO PANAMERICANA DE SAÚDE (OPS/OMS). **Dengue en las Americas**. 2016. Disponível em: <<http://www.bvsde.paho.org/bvsasv/e/fulltext/dengue1/dengue1.html>>. Acesso em: 18 jan. 2017.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO) - WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Epidemiological alert: Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection**. Implications for public health in the Americas. 2015. Disponível em: <http://www.paho.org/hq/index.php?option=com_content&view=category&layout=blog&id=1218&Itemid=2291>. Acesso em: 06 mai. 2016.

PANCHAROEN, C.; THISYAKORN, U. Neurological manifestations in dengue patients. **Southeast Asian J Trop Med Public Health**, v.32, p.341–5, 2001.

PANCHAUD, A., et al. Emerging role of zika virus in adverse fetal and neonatal outcomes. **Clin Microbiol Rev.**, v.29, n.3, p.659–694, 2016.

PELLOW, S. et al. Validation of open: closed arm entries in an elevated plus-maze as a measure of anxiety in the rat. **Journal of Neuroscience Methods**, v.14, n.3, p.149–167, 1985.

PENNUTO, M. et al. Synaptophysin I controls the targeting of VAMP2/Synaptobrevin II to synaptic vesicles. **Molecular Biology of the Cell**, v.14, n.12, p.4909–4919, 2003.

PICÓN, F.R.L. **Neurofilament proteins in the postnatal rat hippocampus: developmental expression and changes in experimental epilepsy**. Turku: University of Turku, 2008, p. 90.

PINHEIRO, M. Fundamentos de Neuropsicologia – O desenvolvimento cerebral da criança. **Rev. Vita, et Sanitas**, Trindade, v.1, n.1, 2007.

PIOVESANA, A.; GONÇALVES, V. Neuroplasticidade. In: MOURA-RIBEIRO, M.V.L.; GONÇALVES, V.M.G., eds. **Neurologia do desenvolvimento da criança**. Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p.130–141.

PRASAD, V. M. et al. Structure of the immature Zika virus at 9A resolution. **Nat Struct Mol Biol.**, v.24, p.184–186, 2017.

PRIYAMVADA, L. et al. B cell responses during secondary dengue infection are dominated by highly cross-reactive, memory-derived plasmablasts. **J Virol.**, v.90, p.5574–5585, 2016a.

PRIYAMVADA, L. et al. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. **Proc Natl Acad Sci USA**, v.113, p.7852–7857, 2016b.

QUINN, R. Comparing rat's to human's age: how old is my rat in people years? **Nutrition**, v.21, n.6, p.775–777, 2005.

RAMOS, C. et al. Dengue virus in the brain of a fatal case of hemorrhagic dengue fever. **J Neurovirol.**, v.4, p.465–8, 1998.

RASMUSSEN, S. A. et al. Zika Virus and Birth Defects - Reviewing the Evidence for Causality. **N Engl J Med**. 2016.

REED, U. C. Desenvolvimento normal do sistema nervoso central. Cap.21. In: NITRINI, R.; BACHESCHI, L. A. **A neurologia que todo médico deve saber**. 2.ed. São Paulo: Atheneu, 2005.

REEVES, S.L. et al. M-Track: A New Software for Automated Detection of Grooming Trajectories in Mice. **PLOS Comput. Biol.**, 2016.

RICE, D.; BARONE, Jr. S. Critical periods of vulnerability for the developing nervous system: evidence from humans and animal models. **Environmental Health Perspectives**, v.108, n.3, p.511-533, 2000.

ROSSI, S. L. et al. Characterization of a novel murine model to study Zika Virus. **Am J Trop Med Hyg.**, v.94, p.1362–1369, 2016;

ROW, B. W. et al. Spatial pre-training attenuates hippocampal impairments in rats exposed to intermittent hypoxia. **Neuroscience Letters**, v.339, p.67-71, 2002.

SANTOS, A. Aprendizagem e memória no labirinto aquático de Morris. In: XAVIER, G.F., org. **Técnicas para o estudo do sistema nervoso**. São Paulo: Plêiade, 1999. p.131–154.

SCHLÜTER, O. M.; XU, W.; MALENKA, R. C. Alternative N-terminal domains of PSD-95 and SAP97 govern activity-dependent regulation of synaptic AMPA receptor function. **Neuron**, v. 51, n. 1, p. 99-111, 6 jul. 2006.

SCHULER-FACCINI, L. et al. **The Morbidity and Mortality Weekly Report**, v.65, p.59–62, 2016.

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE MINAS GERAIS. **CIEVS MINAS – Centro de Informações Estratégicas em Vigilância em Saúde de Minas Gerais**. Nota Técnica sobre Zika virus (ZIKV). 2015. Disponível em: <http://www.hc.ufpr.br/arquivos/06475_nota_tecnica_sobre_zika_virus.pdf>. Acesso em: 01 mai. 2016.

SEMPLE, B. D., et al. Brain development in rodents and humans: identifying benchmarks of maturation and vulnerability to injury across species. **Prog Neurobiol.**, p.1–16, 2013.

SILVA, E. F. et al. A tetravalent dengue nanoparticle stimulates antibody production in mice. **Journal of Nanobiotechnology**, v.10, p.13, 2012.

SIROHI, D., et al. The 3.8Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Science**, v.352, p.467–470, 2016.

SKINNER, B.F. Selection by consequences. **Science**, v.213, p.501-504, 1981.

SMITH, D. R., et al. Neuropathogenesis of Zika virus in a highly susceptible immunocompetent mouse model after antibody blockade of type I interferon. **PLoS Negl Trop Dis.**, v.11, 2017.

SMITH, S. A. et al. Persistence of circulating memory B cell clones with potential for dengue virus disease enhancement for decades following infection. **J Virol.**, v.86, p.2665–2675, 2012.

SOLOMON, T., et al. Neurological manifestations of dengue infection. **Lancet.**, v.355, p.1053–9, 2000.

SPRUIJT, B. M.; VAN HOOFF, J. A. R. A. M.; GISPEN, W. H. Ethology and neurobiology of grooming behavior. **Physiol. Rev.** v.72, p.825–85, 1992.

STEINER, P. et al. Destabilization of the postsynaptic density by PSD-95 serine 73 phosphorylation inhibits spine growth and synaptic plasticity. **Neuron**, v.60, n.5, p.788–802, 2008.

STETTLER, K., et al. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. **Science**, v.353, p.823–826, 2016.

SZAPACS, M.E. et al. Exploring the relationship between serotonin and brain-derived neurotrophic factor: analysis of BDNF protein and extraneuronal 5-HT in mice with reduced serotonin transporter or BDNF expression. **Journal of Neuroscience Methods**, v.140, n.1/2, p.81–92, 2004.

SZEJNFELD, P. O. et al. Congenital brain abnormalities and Zika Virus: What the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. **Radiology**, 2016.

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, v.8, n.5, p.587–590, 2016.

TANG, S.; MACHAALANI, R.; WATERS, K.A. Brain-derived neurotrophic factor (BDNF) and TrkB in the piglet brainstem after post-natal nicotine and intermittent hypercapnic hypoxia. **Brain Research**, v.1232, p.195–205, 2008.

TAPPE, D. et al. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. **Euro Surveill.**, v.19, n.4, 2014.

TENNEKOON, G.I. et al. Myelinogenesis in optic nerve: a morphological, autoradiographic and biochemical analysis. **Journal of Cell Biology**, v.72, n.3, p.604–616, 1977.

THOENEN, H. Neurotrophins and neuronal plasticity. **Science**, v.270, n.5236, p.593–598, 1995.

TOGNARELLI, J. et al. A report on the outbreak of Zika vírus on Easter Island. **Arch Virol.**, South Pacific, v.161, p.665-8, 2016.

TORRES-PACHECO, L.H.L. **Avaliação do desenvolvimento do sistema nervoso central de camundongos Balb/c expostos à fumaça do cigarro no início do período pós-natal.** 139p. Tese (Doutorado–Faculdade de Ciências Farmacêuticas) - Universidade de São Paulo, São Paulo; 2013.

TREIT, D.; MENARD, J.; ROYAN, C. Anxiogenic stimuli in the elevated plus-maze. *Pharmacology*, **Biochemistry and Behavior**, v.44, p.463-69, 1993.

TYL, R.W.; MARR, M.C. Developmental toxicity testing: methodology. In: Hood, R.D., ed. **Developmental and reproductive toxicology: a practical approach.** 2.ed. Boca Raton: CRC Press, 2006, p. 201-262.

UNITED STATES. Environmental Protection Agency. Prevention, Pesticides and Toxic Substances. **Health effects test guidelines OPPTS 870.6300 developmental neurotoxicity study.** 1998. Disponível em <<http://www.peta.org/feat/braindead/Exhibit2.pdf>>. Acesso em: 27 jan 2017.

URBAN, N.; GUILLEMOT, F. Neurogenesis in the embryonic and adult brain: same regulators, different roles. **Front. Cell. Neurosci.**, v.8, p.396, 2014.

VALADARES, C.T. **Efeitos da desnutrição protéica pós-natal no desempenho de ratos em diferentes tarefas de aprendizagem e memória.** 72p. Tese (Doutorado - Faculdade de Filosofia, Ciências e Letras de Ribeirão Preto) – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto; 2006.

VALENTE, M. Mielinização do sistema nervoso. In: MOURA-RIBEIRO, M.V.L.; GONÇALVES, V.M.G., eds. **Neurologia do desenvolvimento da criança.** Rio de Janeiro: Revinter, 2006. p.109–129.

VALERA, E. M. et al. Meta-analysis of structural imaging findings in attention-deficit/hyperactivity disorder. **Biological Psychiatry**, v.61, n.12, p.1361–1369, 2007.

van den POL, A. N. et al. Zika virus targeting in the developing brain. **J. Neurosci.**, v.37, p.2161–2175, 2017.

van der LINDEN, V., et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. **BMJ.**, v.354, 2016.

VASCONCELOS, P. F., et al. Involvement of the central nervous system in dengue fever: three serologically confirmed cases from Fortaleza, Ceará, Brazil. **Rev Inst Med Trop.**, v.40, p.35–9, 1998.

VELOSO, A. W. et al. Modulation of grooming behavior in rats by different test situations. **Psychology & Neuroscience**, v.9, n.1, p.91-104, 2016.

VENTURA C. V, et al. Zika: neurological and ocular findings in infant without microcephaly. **The Lancet**, v.387, p.2502, 2016.

VILLABONA-ARENAS, C. J.; ZANOTTO, P. M. A. Worldwide Spread of Dengue Virus Type 1. **PLOS ONE**, v.8, n.5, 2013.

WALDORF, K. M. A. et al. Fetal brain lesions after subcutaneous inoculation of Zika virus in a pregnant nonhuman primate. **Nature Medicine**, [s.l.], v. 22, n. 11, p. 1256-1259, 2016.

WEBER, D.N. Mechanisms of behavioral toxicology : an integrated approach. **American Zoologist**, v.37, n.4, p.343–345, 1997.

WELCH, J. M. et al. Cortico-striatal synaptic defects and OCD-like behaviours in Sapap3-mutant mice. **Nature**, v.448, p.894–900, 2007.

WEN, J. et al. Dengue virus-reactive CD8+ T cells mediate cross-protection against subsequent Zika virus challenge. **Nature Communications**, v.8, n.1, p.1-11, 2017a.

WEN, J. et al. Identification of Zika virus epitopes reveals immunodominant and protective roles for dengue virus cross-reactive CD8+ T cells. **Nat. Microbiol.**, v.2, p.17036, 2017b.

WITAYATHANWORNWONG, P. Fatal dengue encephalitis. **South Asian Trop Med Public Health.**, v.36, p.200-2, 2005.

WORKMAN, A. D. et al. Modeling Transformations of Neurodevelopmental Sequences across Mammalian Species. **Journal of Neuroscience**, v.33, n.17, p.7368–7383, 2013.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Dengue**. 2013. Disponível em: <<http://www.who.int/topics/dengue/en/>>. Acesso em: 26 jan. 2017.

XAVIER, G.F.; OLIVEIRA-FILHO, F.J.; SANTOS, A.M. Dentate gyrus-selective colchicine lesion and disruption of performance in spatial tasks: difficulties in “place strategy” because of a lack of flexibility in the use of environmental cues? **Hippocampus**, v.9, n.6, p.668–681, 1999.

YE, Q. et al. Genomic characterization and phylogenetic analysis of Zika virus circulating in the Americas. **Infect. Genet. Evol.**, v.43, p.43–49, 2016.

YEO, P. S. D. et al. Hippocampal involvement in dengue fever. **Singapore Med. J.**, v.46, p.647–50, 2005.

YU, H. et al. Self-grooming induced by sexual chemical signals in male root voles (*Microtus oeconomus Pallas*). **Behav. Processes**, v.83, p.292–8, 2010.

ZELLWEGER, R. M. et al. CD8+ T cells can mediate short-term protection against heterotypic dengue virus reinfection in mice. **J. Virol.**, v.89, p.6494–6505, 2015.

ZELLWEGER, R. M. et al. CD8+ T cells prevent antigen-induced antibody dependent enhancement of dengue disease in mice. **J. Immunol.**, v.193, p.4117–4124, 2014.

ZHAO, W. et al. Nonreceptor tyrosine protein kinase pp60c-src in spatial learning: synapse-specific changes in its gene expression, tyrosine phosphorylation, and protein–protein interactions. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.97, n.14, p.8098-8103, 2000.

ANEXO

ANEXO A – Parecer consubstanciado do Comitê de Ética em Pesquisa



MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO
 Universidade Federal de Alfenas. Unifal-MG
 Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700. Alfenas/MG. CEP 37130-000
 Fone: (35) 3299-1000. Fax: (35) 3299-1063

Comissão de Ética no Uso de Animais – CEUA/UNIFAL



CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Efeitos da infecção pelo Zika vírus no período gestacional de roedores com ou sem imunização prévia pelo Dengue vírus: implicações no desenvolvimento do sistema nervoso central da prole", registrada com o nº 22/2016, sob a responsabilidade de Larissa Helena Lobo Torres Pacheco – que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica – encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA-UNIFAL) DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS, em reunião de 08/08/2016.

Finalidade	() Ensino (X) Pesquisa científica
Vigência da autorização	De 08/08/2016 a 30/06/2017
Espécie/linhagem/raça	Camundongo Swiss / heterogênico
Nº de animais	189
Sexo	Macho (15); Fêmea (30); Filhotes (144)
Origem	Biotério Central da UNIFAL

Alfenas, 11 de agosto de 2016.

Estela Regina de Oliveira

Prof.^a Dr.^a Estela Regina de Oliveira

Coordenadora CEUA-UNIFAL