



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CAMPUS TRINDADE – CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Peterson da Cruz

**Desenvolvimento de metodologias de infecção e diagnóstico de ZIKV
direcionadas à identificação dos sítios de infecção em embriões
de *Gallus gallus***

Florianópolis

2023

Peterson da Cruz

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Castilho Garcez

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

da Cruz, Peterson

Desenvolvimento de metodologias de infecção e diagnóstico de ZIKV direcionadas à identificação dos sítios de infecção em embriões de Gallus gallus / Peterson da Cruz ; orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2023.

81 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. ZIKV. 3. Gallus gallus. 4. Infecção Viral. 5. Hibridização in situ. I. Garcez, Ricardo Castilho. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Peterson da Cruz

**Desenvolvimento de metodologias de infecção e diagnóstico de ZIKV
direcionadas à identificação dos sítios de infecção em embriões
de *Gallus gallus***

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 01 de setembro de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Profa. Virgínia Meneghini Lazzari, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Profa. Talita da Silva Jeremias, Dra.
Instituição Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Castilho Garcez Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho a minha mãe Elis Regina, amigos próximos e ao meu orientador, pois sem eles eu nunca conseguiria ter alcançado esse objetivo.

AGRADECIMENTOS

Quando olho para trás e vejo toda a jornada que percorri até concluir esta dissertação, não posso deixar de expressar minha gratidão a todos aqueles que estiveram ao meu lado, me apoiando e incentivando a seguir em frente. É com imensa alegria que dedico este espaço para expressar meus sinceros agradecimentos.

Em primeiro lugar, gostaria de agradecer à pessoa mais importante da minha vida, minha mãe, Dona Elis Regina. Se hoje estou aqui, é graças ao seu amor incondicional, apoio inabalável e encorajamento constante. Suas palavras de ânimo e sabedoria foram a luz que guiou meus passos em todos os momentos desafiadores desta jornada acadêmica.

À minha família em geral, mas em especial à minha tia Adriana, que diversas vezes estendeu as mãos para me ajudar sempre que precisei. Além disso, minha namorada, Maryele, foi um suporte muito grande e me ajudou muito a passar por essa fase. Por tudo isso, meu coração transborda de gratidão por todo o apoio e compreensão ao longo dessa jornada. O incentivo e carinho que recebi de cada membro da minha família foram fundamentais para que eu enfrentasse os desafios e alcançasse este objetivo.

Ao meu orientador, Prof. Ricardo, cuja dedicação, conhecimento e orientação foram essenciais para o desenvolvimento deste trabalho. Suas contribuições críticas e perspicazes elevaram este trabalho a um patamar superior e ampliaram meus horizontes acadêmicos. Além dos conselhos de vida e por mostrar que, mesmo quando eu não acreditava em mim mesmo muitas vezes, era capaz de alcançar meus objetivos.

Aos meus amigos, que conheci durante esse processo de pós-graduação e que vou levar para o resto da minha vida, em especial à Camis e à Bea, que em diversos momentos, bons e ruins, me apoiaram e tornaram essa caminhada mais leve. Quero agradecer também ao pessoal do LACERT, que foram verdadeiros pilares durante todo o percurso, sempre solícitos e prestativos, ensinando tudo sobre pesquisas e técnicas, além de estarem sempre presentes, seja nas longas horas de estudo, nas discussões enriquecedoras ou nas palavras de encorajamento. Essas amizades tornaram esta jornada mais memorável e tranquila.

Também quero expressar meus agradecimentos aos meus amigos de longa data, como Wanderley e sua família, que, mesmo sem contato constante, estavam

sempre lá quando precisei. A Vagner e a Rafa, que me deram afilhados lindos e sempre mostraram apoio em tudo, à Naíra e suas conversas, me ouvindo sobre as dificuldades de fazer o mestrado, entre outros diversos amigos que fizeram parte de toda essa caminhada acadêmica.

Agradeço a todos os professores do programa de pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da UFSC, pois cada um de vocês contribuiu para o meu crescimento intelectual e me incentivou a buscar sempre o conhecimento de forma apaixonada e dedicada.

Também expresso minha gratidão às instituições que possibilitaram o desenvolvimento deste estudo. À Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), por proporcionar um ambiente acadêmico enriquecedor e oferecer recursos para a realização deste trabalho.

Assim como à Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão Universitária (FAPEU) pela gestão dos recursos das Emendas 71260014/2020 e 41850003/2021 que financiaram esse projeto, à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPQ), ao Laboratório de Células-tronco e Regeneração Tecidual (LACERT) e ao Laboratório Multiuso de Estudos em Biologia (LAMEB) da UFSC pelos auxílios financeiros e oportunidades de estudo que viabilizaram esta pesquisa.

Por fim, agradeço a todos que, de alguma forma, estiveram envolvidos neste projeto, direta ou indiretamente, contribuindo para a sua realização. A cada pessoa que cruzou meu caminho, deixando um pouco de sua sabedoria e apoio, minha eterna gratidão.

Este trabalho não representa apenas a conclusão de um ciclo acadêmico, mas também uma prova do poder da dedicação e da colaboração mútua. A todos vocês, o meu mais profundo MUITO OBRIGADO!

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um Flavivírus. Seu principal modo de transmissão é vetorial, através do mosquito *Aedes aegypti*. O ZIKV foi descoberto em 1947 na floresta Zika, em Uganda, na África, mas só recebeu atenção especial de organizações internacionais de saúde em 2015 e 2016. Nesse período, o ZIKV foi pela primeira vez associado a diversos casos de malformações congênitas, sendo a microcefalia a mais grave delas. Estudos mostram que o ZIKV tem preferência por progenitores neurais, mas isso não explica totalmente algumas das malformações observadas em embriões infectados pelo ZIKV. A fim de identificar faixas etárias e regiões anatômicas potencialmente suscetíveis à infecção pelo ZIKV, nesse trabalho foram realizadas uma série de infecções pelo ZIKV em embriões de *Gallus gallus*, que são naturalmente suscetíveis à infecção pelo ZIKV humano. Em nossos testes, as infecções por ZIKV foram realizadas diretamente *in ovo* na região cardíaca dos embriões com 72h e 96h de desenvolvimento (E3 e E4, respectivamente), com intervalo de 24h entre a infecção e a retirada do embrião para análise. As análises revelaram que houve aproximadamente 19 vezes mais replicação viral em embriões infectados em E4 quando comparados aos infectados no E3. Além disso, os embriões infectados em E4 apresentaram uma taxa de suscetibilidade à infecção pelo ZIKV de 78,78%, superior às taxas de E3, que foram de 33,30%. Para identificar as regiões com maior presença de ZIKV, foi desenvolvida uma sonda de RNA marcada com digoxigenina, direcionada especificamente para o ZIKV. Cabeças de embriões infectados com idade de E3 foram submetidas à hibridização *in situ* (ISH), que teve como objetivo mapear as regiões anatômicas com maior presença do ZIKV. Embora os resultados da marcação sejam muito preliminares, a sonda mostrou marcações em áreas como telencéfalo, olhos e arcos braquiais, áreas conhecidas pela presença do ZIKV. Esses resultados ajudarão a identificar não apenas regiões específicas, mas também novos locais de infecção pelo ZIKV em embriões inteiros, permitindo ampliar nosso conhecimento sobre as ações do ZIKV durante o desenvolvimento.

Palavras-chave: ZIKV; Infecção Viral; *Gallus gallus*, Hibridização *in situ*.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is a member of the Flavivirus genus, primarily transmitted through vectors, specifically the *Aedes aegypti* mosquito. ZIKV was initially discovered in 1947 in the Zika forest in Uganda, Africa. However, it only garnered significant attention from international health organizations in 2015 and 2016. During this period, ZIKV was first associated with various cases of congenital malformations, with microcephaly being the most severe among them. Studies propose that ZIKV exhibits a preference for neural progenitors. However, this doesn't entirely explain certain malformations observed in embryos infected with the virus. In order to discern age ranges and anatomical regions that are potentially susceptible to ZIKV infection, this study conducted a series of ZIKV infections in embryos of *Gallus gallus*, which are naturally susceptible to human ZIKV infection. In our experiments, ZIKV infections were directly administered *in ovo* to embryos at 72 hours and 96 hours of development (E3 and E4, respectively), with a 24-hour interval between infection and embryo retrieval for analysis. The analyses revealed that there was approximately 19-fold change viral replication in embryos infected at E4 compared to those infected at E3. Moreover, embryos infected at E4 exhibited a susceptibility rate to ZIKV infection of 78.78%, surpassing the rates of E3, which were 54.20%. To pinpoint regions with a higher ZIKV presence, a digoxigenin-labeled RNA probe was developed, specifically targeting ZIKV. Heads of embryos infected at E3 were subjected to *in situ* hybridization (ISH), aimed at mapping anatomical regions with a greater ZIKV presence. While the results of the labeling are preliminary, the probe exhibited markings in areas such as the telencephalon, eyes, and branchial arches regions known for ZIKV presence. These findings will not only aid in identifying specific regions but also new sites of ZIKV infection in entire embryos, thereby enhancing our understanding of ZIKV actions during development.

Keywords: ZIKV; Viral Infection; *Gallus gallus*; *In situ* Hybridization.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Infográfico dos modos de infecção do ZIKV em humanos	17
Figura 2 - Complicações neonatal relacionada a SCZ	18
Figura 3 - Tipos de microcefalia e sistema nervoso central humano.....	19
Figura 4 - Malformações causadas pela infecção do ZIKV	20
Figura 5 - Estrutura do ZIKV.....	21
Figura 6 - Comparação da fase embrionária humana com a de <i>G. gallus</i>	24
Figura 7 - Desenho experimental	29
Figura 8 - Esquema de incubação e inoculação em embriões de <i>G. gallus</i> com ZIKV	31
Figura 9 - Fotos realizadas dos embriões após sua retirada dos ovos pós-inoculação viral.....	32
Figura 10 - Esquema do processamento das amostras	35
Figura 11 - Separação da membrana amniótica e alantoide dos embriões	40
Figura 12 - Taxa de sobrevivência dos embriões inoculados.....	41
Figura 13 - Melt curve do gene Mrps27.....	42
Figura 14 - Melt curve do Gene Dlx5.....	43
Figura 15 - Teste de validação dos primers para diagnóstico do ZIKV	44
Figura 16 - RT-LAMP para diagnóstico do ZIKV	45
Figura 17 - RT-LAMP em com enzima de transcrição reversa.....	46
Figura 18 - RT-qPCR diagnóstica para ZIKV dos embriões em idade de E3 e E4....	47
Figura 19 - Eficácia de infecção em embriões inoculados com 300PFU de ZIKV.....	47
Figura 20 - Quantificação viral dos embriões infectados com ZIKV e com diagnóstico positivo	48
Figura 21 - Correlação das membranas amnióticas, alantoide com embriões inteiros positivos para ZIKV	50
Figura 22 - <i>Melt curve</i> da RT-PCR para avaliar os primers da produção da sonda de hibridização <i>in situ</i>	51
Figura 23 - Gel da RT-PCR da sonda ZIKV de hibridização <i>in situ</i>	52
Figura 24 - Embrião em idade de E3 marcado para Fgf8	53
Figura 25 - Sítios de infecção de ZIKV marcados por hibridização <i>in situ</i>	54
Figura 26 - Gráfico do índice de sobrevivência dos embriões realizados nesse estudo e nos estudos do grupo	78

Figura 27 - Gráfico dos genes de referência	80
Figura 28 - Análise da carga viral das membranas e embriões.....	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - <i>Primers</i> utilizados RT-LAMP	35
Tabela 2 - <i>Primers</i> e sonda utilizado para diagnóstico e quantificação do ZIKV e produção da sonda de hibridização <i>in situ</i>	36
Tabela 3 - <i>Primers</i> utilizados para expressão de genes de referência	37
Tabela 4 - Embriões inteiros e membranas positivas para ZIKV	49
Tabela 5 - Número de embriões positivos por grupo de infecção	79

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Anti-Dig	Anticorpo Secundário Anti-digoxigenina
ANVISA	Agência Nacional de Vigilância Sanitária
BCIP	Sal de p-toluidina de 5-bromo-4-cloro-3'-indolifosfato
Bi	Broto do Membro Inferior
Bs	Broto do Membro Superior
Bu	Bulbo
CCA	Centro de Ciências Agrárias
CEUA	Comissão de Ética no Uso de Animais
CIBio	Comissão Interna de Biossegurança
CN	Crista Neural
Co	Coração
Cq	Ciclos de Quantificação
DENV	Vírus da Dengue
Di	Diencefalo
Dig	Digoxigenina
DLX5	Proteína Distal-less Homeobox 5
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle Medium</i>
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
DNAg	Ácido Desoxirribonucleico Genômico
DPEC	Pirocarbonato de Dietila
E3	Três Dias de Desenvolvimento (Idade Embrionária)
E4	Quatro Dias de Desenvolvimento (Idade Embrionária)
E5	Cinco Dias de Desenvolvimento (Idade Embrionária)
EDTA	Ácido Etilenodiaminotetracético
Fgf8	Fator de Crescimento de Fibroblastos 8
FIOCRUZ	Fundação Oswaldo Cruz
Fr	Ossos Frontal
g	Força Gravitacional
<i>G. gallus</i>	<i>Gallus gallus</i>
h	Hora(s)
HH	Estágio de Desenvolvimento Embrionário de <i>Gallus gallus</i>
LACERT	Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual

LAMP	Amplificação Isotérmica Mediada por Loop
Ma	Mandíbula
Me	Mesencéfalo
ml	Mililitro
mm	Milímetros
mM	Milimolar
MRPS27	Proteína Ribossômica Mitocondrial S27
Mx	Maxila
Nº	Número Amostral
NBT	Nitro Azul Cloreto de Tetrazólio
ng	Nanograma
NS1	Proteína não Estrutural 1 do vírus da Zika
NS2A	Proteína não Estrutural 2A do vírus da Zika
NS2B	Proteína não Estrutural 2B do vírus da Zika
NS3	Proteína não Estrutural 3 do vírus da Zika
NS4A	Proteína não Estrutural 4A do vírus da Zika
NS4B	Proteína não Estrutural 4B do vírus da Zika
NS5	Proteína não Estrutural 5 do vírus da Zika
Oc	Osso Occipital
OI	Olho
p	Probabilidade de Significância
Pa	Osso Parietal
PBS	Salina Tamponada com Fosfato
PBT	Salina tamponada com Fosfato + Tween20
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
PFU	Unidade Formadora de Placas
Po	Ponte
qPCR	Reação em Cadeia da Polimerase Quantitativa
RNA	Ácido Ribonucleico
RT	Transcrição Reversa
SBF	Soro Bovino Fetal
SCZ	Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SNC	Sistema Nervoso Central

TAE	Tampão de Tris, Ácido Acético e EDTA
Te	Telencéfalo
Tp	Osso Temporal
U	Unidade
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
UR	Umidade Relativa do Ar
X	Vezes
YFV	Vírus da Febre Amarela
ZIKV	Vírus da Zika
µg	Micrograma
µl	Microlitros
µM	Micromolar
°C	Graus Celsius
%	Porcentagem
R\$	Real Brasileiro (Moeda)

SUMÁRIO

1 Introdução.....	16
1.1 OS PROBLEMAS QUE O ZIKV POR CAUSAR A SOCIEDADE	17
1.2 CÉLULAS SUSCEPTÍVES A INFECÇÃO PELO ZIKV	21
1.3 OS MODELOS DE ESTUDO PARA INFECÇÃO DO ZIKV E DIAGNÓSTICO....	22
2 Justificativa.....	26
3 Objetivos	27
3.1 OBJETIVO GERAL	27
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	27
4 Metodologia	28
4.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL	28
4.2 MODELO ANIMAL	29
4.2.1 Obtenção dos embriões de <i>G. Gallus</i>.....	30
4.3 VÍRUS DA ZIKA	30
4.3.1 Inoculação de embriões de <i>G. gallus</i> com ZIKV <i>in ovo</i>	30
4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA.....	32
4.4.1 Extração de RNA	32
4.4.2 Qualidade e Quantificação do RNA	33
4.5 DIAGNÓSTICO DO ZIKV	33
4.5.1 RT-LAMP	33
4.5.2 RT-qPCR.....	35
<i>4.5.2.1 Análise de expressão dos genes de referência MRPS27 e DLX5.....</i>	<i>36</i>
4.6 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO ZIKV - RT-QPCR.....	37
4.7 HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i> EM EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i>	38
4.7.1 Produção da sonda de RNA marcado com digoxigenina para hibridização <i>in situ</i> 38	
4.7.2 Hibridização <i>in situ</i>.....	38
4.8 DIAGNÓSTICO DO ZIKV PELAS MEMBRANAS EXTRA EMBRIONÁRIAS	39
4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS.....	40
5 Resultados	41
5.1 INFECÇÃO PELO ZIKV VIA REGIÃO CARDÍACA NÃO AFETA A SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i>	41
5.2 RNAs EXTRAÍDOS DE EMBRIÕES INOCULADOS COM ZIKV	42

5.3 DIAGNÓSTICO DE ZIKV POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-LAMP)	43
5.3.1 Teste dos <i>primers</i> utilizados para RT-LAMP	43
5.3.2 Diagnóstico de ZIKV por RT-LAMP	44
5.4 ZIKV INFECTA EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i> COM EFICIÊNCIA VARIÁVEL, CONFORME A IDADE	46
5.5 A EFICIÊNCIA DA REPLICAÇÃO DO ZIKV É DEPENDENTE DA IDADE DO EMBRIÃO DE <i>G. GALLUS</i>	48
5.6 A QUANTIDADE DE ZIKV PRESENTE NAS MEMBRANAS EXTRAEMBRIÓNICAS ESTÁ CORRELACIONADA À CARGA VIRAL DO EMBRIÃO	49
5.7 LOCALIZAÇÃO DO ZIKV NA CABEÇA DOS EMBRIÕES POR HIBRIDIZAÇÃO <i>IN SITU</i>	50
5.7.1 Padronização de técnica de hibridização <i>in situ</i>	52
5.7.2 Hibridização <i>in situ</i> para ZIKV em embriões de E3	53
6 Discussão	55
7 Conclusão	63
8 Perspectivas	64
REFERÊNCIAS	65
Apêndices	78
APÊNDICE A – SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES	78
APÊNDICE B – NÚMERO DOS EMBRIÕES POSITIVOS	79
APÊNDICE C – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GENES DE REFERÊNCIA	80
APÊNDICE D – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MEMBRANAS E EMBRIÕES INTEIROS	81

1 INTRODUÇÃO

O vírus da Zika (ZIKV) é um flavivírus, e sua principal forma de transmissão é através de um vetor, o mosquito *Aedes aegypti*, assim como outros flavivírus, como o vírus da Dengue (DENV) e o vírus da Febre Amarela (YFV), que também são endêmicos no Brasil. A infecção pelo ZIKV apresenta características muito particulares. O DENV e a YFV apresentam sintomas mais graves, sendo possível, em alguns casos, levar o paciente a óbito. O ZIKV em adultos apresenta sintomas mais brandos, geralmente manifestando-se como dor articular, conjuntivite, cefaleia e febre. No entanto, o ZIKV pode trazer problemas muito graves para algumas pessoas, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) em adultos e a microcefalia em recém-nascidos (Benavides-Lara *et al.*, 2021; Musso; Gubler, 2016; Schram, 2016).

A descoberta do ZIKV ocorreu em 1947 na floresta de Zika, em Uganda, no continente africano, em macacos rhesus. A primeira infecção descrita de ZIKV infectando humanos aconteceu em 1953, na Nigéria. Por décadas, raramente a infecção em humanos havia sido detectada, sendo registrados pouco mais de 20 casos até os primeiros surtos. O primeiro surto de ZIKV foi registrado no ano de 2007, na ilha de Yap, localizada no Pacífico Ocidental (Micronésia), seguido por outros surtos e epidemias na Polinésia Francesa em 2013 e 2014, e diversas ilhas do Pacífico (Gubler; Vasilakis; Musso, 2017; Herrera *et al.*, 2017). No Brasil, os primeiros registros ocorreram em março de 2015. Nesse mesmo ano, a infecção pelo ZIKV foi declarada pelo Ministério da Saúde do Brasil como uma emergência de saúde. Em 2016, o ZIKV já estava circulando por vários países da América do Sul e Central, chegando até Cabo Verde (Brasil, 2017; Musso; Gubler, 2016).

A infecção pelo ZIKV apresenta sintomas que muitas vezes são confundidos com um resfriado, e por esse motivo, durante muito tempo, não se associou a infecção pelo ZIKV a outras condições epidemiológicas. No entanto, em 2015, na região nordeste do Brasil, houve um aumento na frequência de casos de microcefalia congênita nas áreas com alta infecção pelo ZIKV. Isso fez com que as autoridades de saúde associassem, pela primeira vez, os casos de microcefalia à infecção causada pelo ZIKV. A partir desse momento, diversos estudos confirmaram essa associação (Albuquerque *et al.*, 2018; Antoniou *et al.*, 2020; Cdc, 2019; Who, 2016). Estudos posteriores também mostraram a capacidade do ZIKV de atravessar a barreira placentária e infectar diretamente o embrião/feto (Figura 1). A transmissão do ZIKV

por via sexual também foi registrada, e estudos mostram que é possível que a transmissão ocorra com maior frequência do homem para a mulher, pois o epidídimo no testículo é um reservatório para a replicação do ZIKV (Counotte *et al.*, 2018; Krauer *et al.*, 2017; Lee *et al.*, 2021; Newman *et al.*, 2021; Schram, 2016).

Figura 1 - Infográfico dos modos de infecção do ZIKV em humanos



Fonte: Adaptado de Cdc (2022). Traduzido pelo autor.

Legenda: Fontes de transmissão do ZIKV, que além da via vetorial pode acontecer de forma vertical de mãe para filho, transmissão sexual ou ainda por transfusão de sangue infectado com o vírus da Zika.

1.1 OS PROBLEMAS QUE O ZIKV PODE CAUSAR À SOCIEDADE

O ZIKV tem o potencial de causar diversos danos à sociedade, muitas vezes irreparáveis. A infecção pelo ZIKV está associada ao desenvolvimento da SGB em adultos, além de encefalites e microcefalia (quando a infecção ocorre por via placentária). Em adultos, estima-se que, a cada 100.000 infecções, aproximadamente

24 casos podem resultar no desenvolvimento da SGB. Essa doença tende a debilitar as pessoas por um longo período (de 6 a 12 meses). Além disso, o tratamento desses indivíduos envolve diversas especialidades médicas e profissionais da área de saúde em geral, sendo complexo e com custos elevados até a cura desses pacientes (Barbi *et al.*, 2018; Brasil, 2023; Lorrany *et al.*, 2020; Uncini; Shahrizaila; Kuwabara, 2017). Ainda não existe uma vacina ou antivirais específicos aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (ANVISA) para o tratamento da infecção pelo ZIKV, sendo o tratamento recomendado apenas para aliviar os sintomas, com o uso de analgésicos e antitérmicos (Pinto Junior *et al.*, 2015; Zhou *et al.*, 2021).

O ZIKV pode causar diversas alterações no desenvolvimento de embriões, e essas malformações são chamadas de Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus da Zika (SCZ). A SCZ apresenta diversos fenótipos e alterações neurológicas, oftalmológicas, ortopédicas, entre outras (Masseti *et al.*, 2020) (Figura 2). Sabe-se que crianças que tiveram contato com o ZIKV durante a fase intrauterina podem desenvolver distúrbios neurológicos que vão desde leves até graves, incluindo problemas na fala e dificuldades de mobilidade. No entanto, há casos em que, mesmo quando a mãe foi infectada durante a gravidez, os filhos não apresentam a SCZ, ou não a apresentam em um grau perceptível nos exames clínicos (Abtibol-Bernardino *et al.*, 2020).

Figura 2 - Complicações neonatal relacionada a SCZ

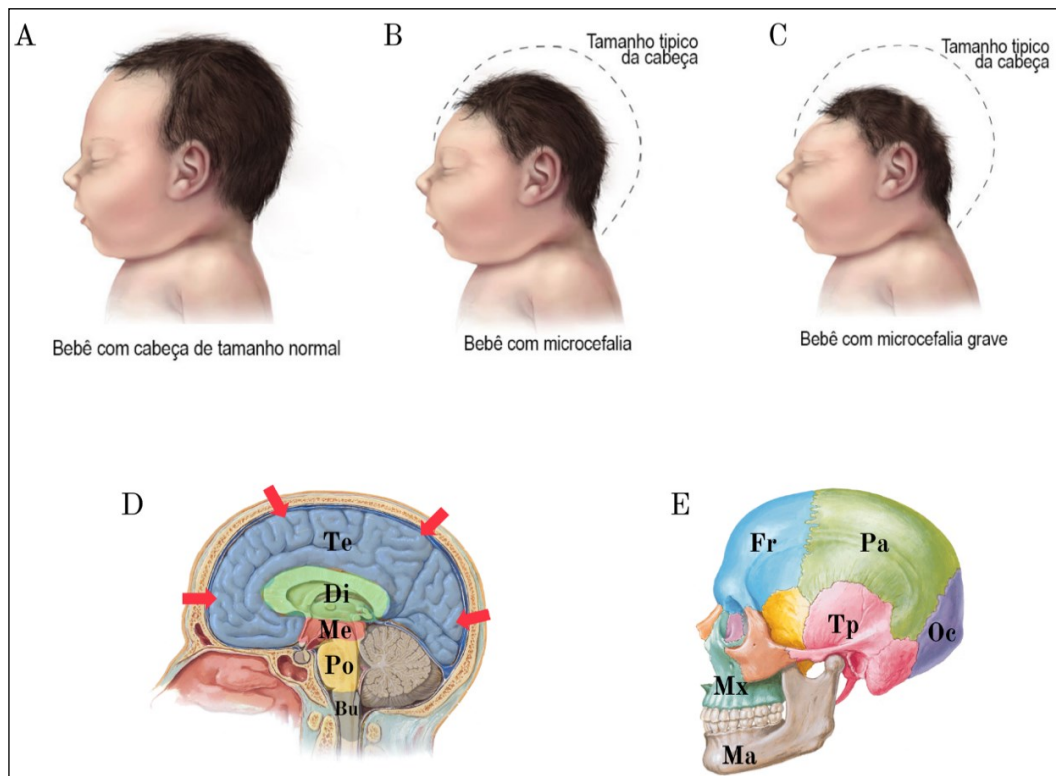


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Diversas complicações em que crianças que desenvolveram SCZ podem apresentar após ao nascimento ou durante o seu desenvolvimento na infância.

A malformação congênita mais frequentemente associada à infecção pelo ZIKV é a microcefalia. Essa condição se caracteriza pela diminuição da região cortical do telencéfalo em crianças recém-nascidas (Figura 3 D), sendo uma condição permanente. Pode se apresentar na forma de microcefalia comum ou na forma grave (Figura 3 B e C). Em diversos casos, dependendo da gravidade da malformação dessas crianças, isso pode ser incompatível com a vida, levando a criança ao óbito logo após o nascimento ou em pouco tempo (Gladwyn-Ng *et al.*, 2017; Merfeld *et al.*, 2017; Priyadarshini, 2018). Para compreender os mecanismos que levam à microcefalia, é necessário realizar uma análise cuidadosa dos tecidos e células afetados na microcefalia induzida pelo ZIKV.

Figura 3 - Tipos de microcefalia e sistema nervoso central humano

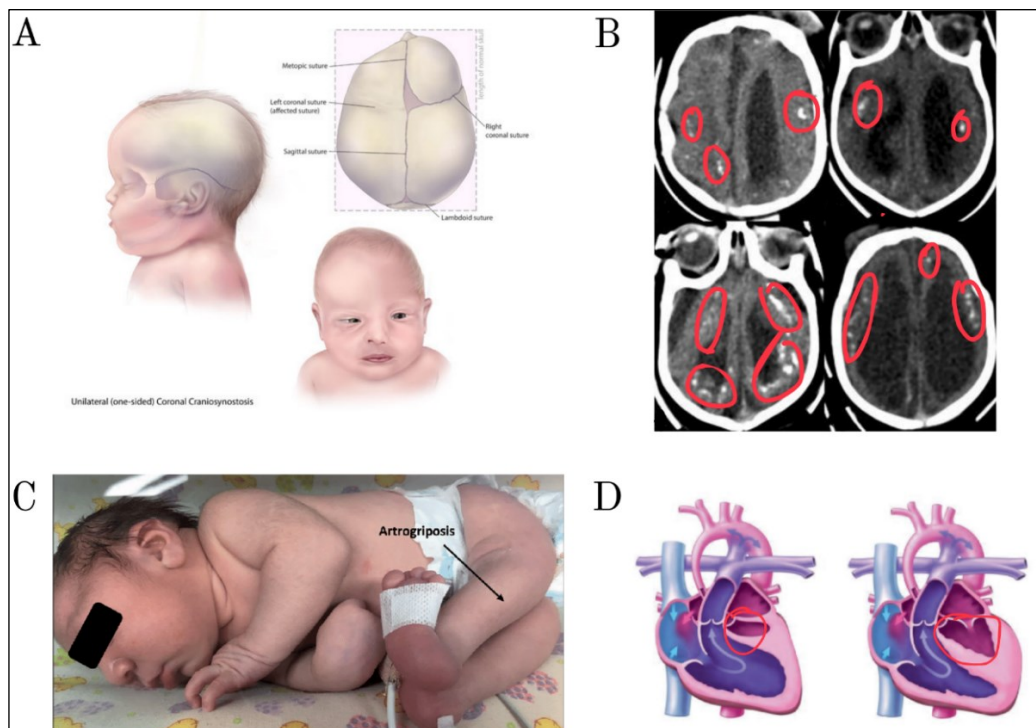


Fonte: Adaptado de Cdc (2022) e Netter (2019).

Legenda: A – Tamanho normal da cabeça de uma criança humana. B – Criança com microcefalia congênita. C – Criança com microcefalia grave com cérebro severamente reduzido. D – Corte sagital da cabeça de humano adulto para mostrar o encéfalo e suas regiões em que Te = Telencéfalo, Di = Diencefalo, Me = Mesencéfalo, Po = Ponte e Bu = Bulbo. As setas vermelhas mostram a região cortical do telencéfalo. E – Cabeça humana do lado esquerdo mostrando os ossos do crânio e da face em que Fr = Osso frontal, Pa = Osso parietal, Oc = Osso occipital, Tp = Osso temporal, Mx = Maxila e Ma = Mandíbula.

O tecido nervoso não é o único afetado, os ossos do crânio apresentam alterações importantes, como redução de tamanho e fechamento precoce de suturas (craniossinostose) (Figura 4 A). Às vezes, as suturas podem ficar sobrepostas e o osso occipital fica proeminente. No cérebro, é notável o aparecimento de calcificações intracranianas, que tipicamente são subcorticais (Figura 4 B). Outras anomalias que podem estar presentes em neonatos que tiveram infecção por ZIKV são alterações oculares, sendo mais comuns a catarata, calcificações intraoculares, manchas pigmentares focais na retina e atrofia do nervo óptico. Além disso, existem relatos de contraturas congênicas que podem estar associadas a uma ou várias articulações (Figura 4 C), e defeitos congênicos do coração, como a síndrome do coração esquerdo hipoplásico, em que a parte esquerda do coração não se desenvolve da maneira correta e fica menor que o lado direito (Figura 4 D) (Cdc, 2023; Coronell-Rodríguez *et al.*, 2016; Lindemann-Wittke, 2021; Mehrjardi *et al.*, 2016; Moore *et al.*, 2017; Rossi *et al.*, 2020).

Figura 4 - Malformações causadas pela infecção do ZIKV



Fonte: (Cdc, 2023; Coronell-Rodríguez *et al.*, 2016; Lindemann-Wittke, 2021; Mehrjardi *et al.*, 2016).

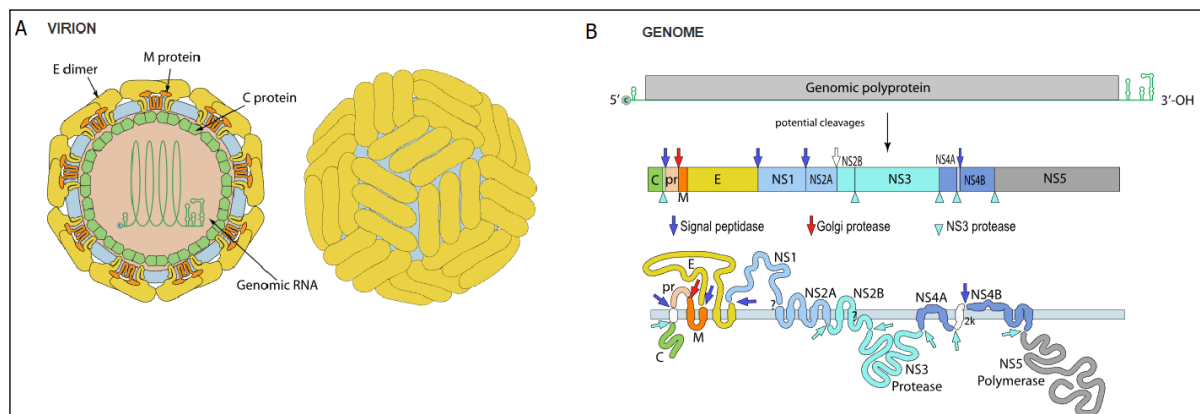
Legenda: Diversas malformações causadas pela infecção do ZIKV que fazem parte da SCZ.

A – Craniossinostose. B – Imagens de tomografia computadorizada mostrando os locais de calcificações do cérebro. C - Contraturas congênicas. D. Síndrome do coração esquerdo hipoplásico.

1.2 CÉLULAS SUSCEPTÍVES A INFECÇÃO PELO ZIKV

O ZIKV apresenta características clássicas de flavivírus. Ele possui um Ácido Ribonucleico (RNA) de fita simples e seu genoma tem cerca de 10,7 kb. No genoma, encontram-se a glicoproteína E (proteína E), a proteína C do capsídeo (proteína C) e a proteína prM. Além disso, existem sete proteínas não estruturais, denominadas NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5, que desempenham funções essenciais na replicação viral, montagem viral e no escapamento do vírus do sistema imune do hospedeiro (Figura 5). Essas proteínas são os principais alvos para estudos de antivirais baseados em estrutura e para a identificação de antígenos visando o desenvolvimento de vacinas (Valente; Moraes, 2019; Ye *et al.*, 2016).

Figura 5 - Estrutura do ZIKV



Fonte: Viralzone.

Legenda: A – Esquema da estrutura do ZIKV. B – Modelo do genoma viral e localização das proteínas virais. NS1 - Proteína não Estrutural 1, NS2A - Proteína não Estrutural 2A, NS2B - Proteína não Estrutural 2B, NS3 - Proteína não Estrutural, NS4A - Proteína não Estrutural 4A, NS4B - Proteína não Estrutural 4B, NS5 - Proteína não Estrutural 5.

A principal via de entrada do ZIKV nas células é o receptor AXL tirosina quinase, uma das proteínas da subfamília tirosina quinase de receptores que também inclui o Tyro3 e Mer tirosina (TAM). Esses receptores são expressos em diversos tipos de células pelo corpo, incluindo as células do sistema nervoso (Dhama *et al.*, 2018; Nowakowski *et al.*, 2016). Nem todas as células que expressam o receptor AXL são infectadas pelo ZIKV, mas os fatores que levam a isso ainda não são completamente compreendidos. Até o momento, as células descritas como mais propensas à infecção pelo ZIKV em adultos são células dendríticas da pele, assim como células do sistema

imunológico, como macrófagos e monócitos, linhagens de osteoblastos, células do sistema nervoso e células estromais mesenquimais cardíacas (Mumtaz *et al.*, 2018; Rossi *et al.*, 2020).

Durante o desenvolvimento, além das células do Sistema Nervoso Central (SNC), as células da Crista Neural (CN) também são infectadas pelo ZIKV (Vue; Tang, 2021; Yan *et al.*, 2019). A CN é dividida em quatro domínios: cranial, vagal, do tronco e sacral (Bronner; Le Douarin, 2010; Ji *et al.*, 2019). As células da CN cranial têm a capacidade de influenciar a expressão gênica das células do telencéfalo (futuro córtex cerebral), além de formar grande parte dos ossos da calota craniana e da face (Creuzet, 2009; Garcez; Le Douarin; Creuzet, 2014). As células da CN cranial apresentam alta taxa de infecção pelo ZIKV. Dentre os efeitos observados *in vitro*, destacam-se a apoptose de parte da população celular e alterações na sinalização de diversos fatores parácrinos. Muitos desses fatores podem estar ligados indiretamente às malformações do cérebro e dos tecidos adjacentes. No entanto, esses autores não conseguiram estabelecer ligações diretas das alterações moleculares observadas com o fenótipo microcefálico (Bayless *et al.*, 2016). As células da CN estão presentes apenas no desenvolvimento embrionário. Elas migram das bordas dorsais do tubo neural em formação para todo o corpo do embrião, formando uma grande diversidade de tipos celulares, como neurônios e células da glia periférica, melanócitos, adipócitos, osteoblastos, condrócitos, entre outras (Trainor; Krumlauf; Bronner-Fraser, 2004). Muitos dos tecidos alterados pela infecção com o ZIKV, ou são formados por células da CN, ou recebem forte influência molecular dessas células durante seu desenvolvimento. Isso poderia explicar algumas das alterações descritas acima.

1.3 OS MODELOS DE ESTUDO PARA INFECÇÃO DO ZIKV E DIAGNÓSTICO

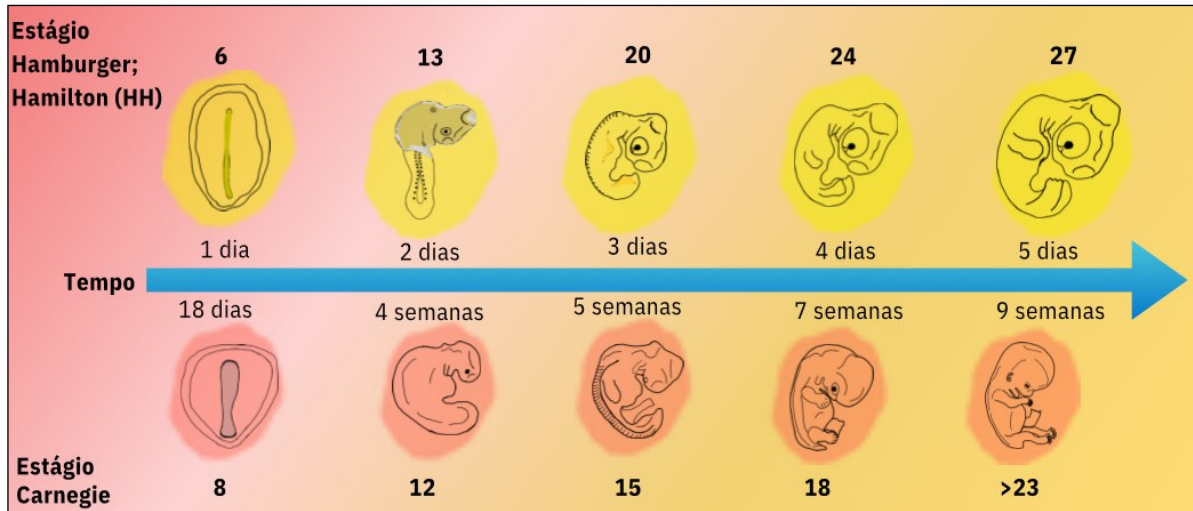
Para compreender as malformações e os tipos de células suscetíveis à infecção pelo ZIKV, os modelos *in vitro* são os mais utilizados, principalmente as culturas de células e organoides. No entanto, os modelos *in vivo* são os mais indicados, podendo ser em mamíferos e aves (Contreras; Arumugaswami, 2016; Julander; Siddharthan, 2017; Su *et al.*, 2022; Xu *et al.*, 2019). Os mamíferos comumente mais utilizados para pesquisa científica são ratos e camundongos, mas esses animais são naturalmente resistentes à infecção pelo ZIKV. O uso de outros mamíferos de maior porte, como primatas não-humanos, acaba gerando altos custos

para mantê-los, sendo inviável na maioria dos casos (Gorman *et al.*, 2018). Uma ótima alternativa é o uso de embriões de *Gallus gallus* (*G. gallus*) como modelo para a infecção pelo ZIKV. Esse modelo apresenta grande relevância, pois a cepa usada do ZIKV que infecta humanos, além de infectar *G. gallus*, também gera fenótipos análogos à SCZ (Goodfellow *et al.*, 2016; Wachholz *et al.*, 2021).

Outra vantagem no uso de embriões de aves para estudar a infecção pelo ZIKV é que o seu desenvolvimento é externo, o que facilita a manipulação, como a inoculação do ZIKV, por exemplo. Nesse caso, não é necessário realizar um procedimento cirúrgico na mãe, o que poderia aumentar as chances de complicações, morte do embrião e/ou da mãe, como nos casos de mamíferos (camundongos ou ratos). Além disso, a inoculação pode não ser precisa, pois parte dos vírus pode infectar a mãe (Körding; Wolpert, 2004; Musso; Gubler, 2016). Isso é contornado em embriões de *Gallus gallus*, pois é possível inocular uma quantidade exata de vírus da Zika, abrindo diversas possibilidades para entender várias características da infecção pelo ZIKV em diferentes idades embrionárias estudadas.

O desenvolvimento de aves e mamíferos apresenta diferenças que devem ser levadas em consideração. Por exemplo, as estruturas como o mesencéfalo ou o telencéfalo apresentam tempos de desenvolvimento e tamanhos diferentes, sendo uma especificidade de cada espécie. No entanto, desde que tomados certos cuidados com as comparações entre aves e humanos, os embriões de aves são excelentes para estudar os efeitos do ZIKV no desenvolvimento (Figura 6) (Bjørnstad *et al.*, 2015; Hamburger; Hamilton, 1951; O'rahilly; Müller, 2010). Já é conhecido que as fases iniciais do desenvolvimento são as mais propícias ao aparecimento de malformações, por inúmeros motivos, como alta taxa de replicação, migração e diferenciação celular, além de perturbações moleculares, que podem acarretar em diversos problemas para o embrião. Comparar a susceptibilidade e a replicabilidade do ZIKV nessas idades traz uma ideia de como é a dinâmica da infecção do ZIKV, podendo esses resultados serem projetados em humanos (Burke *et al.*, 2016).

Figura 6 - Comparação da fase embrionária humana com a de *G. gallus*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Comparação entre o desenvolvimento de embriões de *G. gallus* (Hamburger; Hamilton, 1951) e o período embrionário humano (O'rahilly; Müller, 2010).

Trabalhos anteriores do grupo demonstraram que no modelo de infecção *in ovo* de *G. gallus*, a taxa de embriões que desenvolvem a infecção pelo ZIKV é em torno de 55% com uma carga viral extremamente variável (Benevenuti, 2022; Souza, 2022; Taufer, 2023). Sendo assim, é fundamental que cada embrião seja diagnosticado para que uma análise precisa possa ser realizada. Além disso, a grande variabilidade da carga viral exige um número amostral relativamente grande. Isso implica num custo alto para a realização desse tipo de projeto de pesquisa. Por essa razão, nesse projeto foram testadas outras alternativas de diagnóstico para o ZIKV com menor custo.

Diversos modelos diagnósticos já foram utilizados para o diagnóstico do ZIKV, incluindo testes sorológicos e moleculares (Burrell; Howard; Murphy, 2017). No entanto, como é necessário um grande número de amostras para realizar esse estudo, a redução de custos se faz necessária. A técnica de *reverse transcription Loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP) para o diagnóstico do ZIKV é uma das escolhas mais econômicas, conforme descrito por vários trabalhos realizados nos últimos anos (Aonuma *et al.*, 2022). Além disso, a enzima polimerase Bst 3.0, segundo o fabricante, apresenta atividade de transcrição reversa. Para a quantificação viral, o uso de *reverse transcription polymerase chain reaction quantitatively* (RT-qPCR), além de confirmar o diagnóstico do ZIKV, permite também a quantificação da carga viral de cada amostra (Gregorova; Heinonen; Sarin, 2022). A RT-qPCR, sendo o padrão-ouro

de diagnóstico molecular, é possível verificar com maior precisão a extensão da replicação viral, identificando em quais indivíduos e/ou em que estágios do desenvolvimento embrionário o vírus apresenta maior replicação. O que pode evidenciar qual idade em que o ZIKV pode estar causando mais perturbações moleculares, levando a sintomas mais severos da SCZ.

2 JUSTIFICATIVA

É fundamental que a dinâmica de infecção pelo ZIKV durante o desenvolvimento em diferentes idades embrionárias seja bem compreendida e que as células e tecidos suscetíveis ao ZIKV durante esse processo sejam identificados. Uma vez conhecidos os alvos do ZIKV, seria possível identificar alterações sutis no desenvolvimento, pois malformações discretas que podem causar danos ao indivíduo muitas vezes só são perceptíveis quando as manifestações clínicas já estão bastante avançadas.

Para realizar estudos em embriões infectados com o ZIKV, é interessante utilizar modelos que simulem a infecção em humanos. O embrião de *Gallus gallus* é naturalmente suscetível à infecção pela cepa do ZIKV humano, o que permite a coleta de dados que poderão contribuir para a determinação dos períodos críticos do desenvolvimento para a infecção pelo ZIKV (Dick; Kitchen; Haddow, 1952; Goodfellow *et al.*, 2016; Gomes *et al.*, 2023).

Conhecer os períodos críticos de infecção pelo ZIKV permitirá entender os locais de infecção e, conseqüentemente, estudar com mais detalhes os efeitos do ZIKV sobre essas áreas. Além disso, esse tipo de informação poderá servir de base para a elaboração de políticas públicas que visem mitigar os efeitos deletérios do ZIKV durante o desenvolvimento humano.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Desenvolver metodologias que permitam identificar os períodos de maior susceptibilidade à infecção e replicação, além de permitir a marcação do ZIKV, durante o início do desenvolvimento embrionário, em *Gallus gallus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Padronizar um método de infecção do *in ovo* não letal de ZIKV, na região cardíaca de embriões de *Gallus gallus*;
- Avaliar métodos moleculares para diagnóstico do ZIKV compatível com o modelo de infecção *in ovo*, que apresente melhor custo benefício;
- Identificar, durante o desenvolvimento inicial de *Gallus gallus*, idade mais susceptível para infecção com ZIKV;
- Desenvolver uma sonda de RNA marcada com digoxigenina que permita a marcação e identificação dos sítios de infecção do ZIKV em embriões de *Gallus gallus*.

4 METODOLOGIA

4.1 ABORDAGEM EXPERIMENTAL

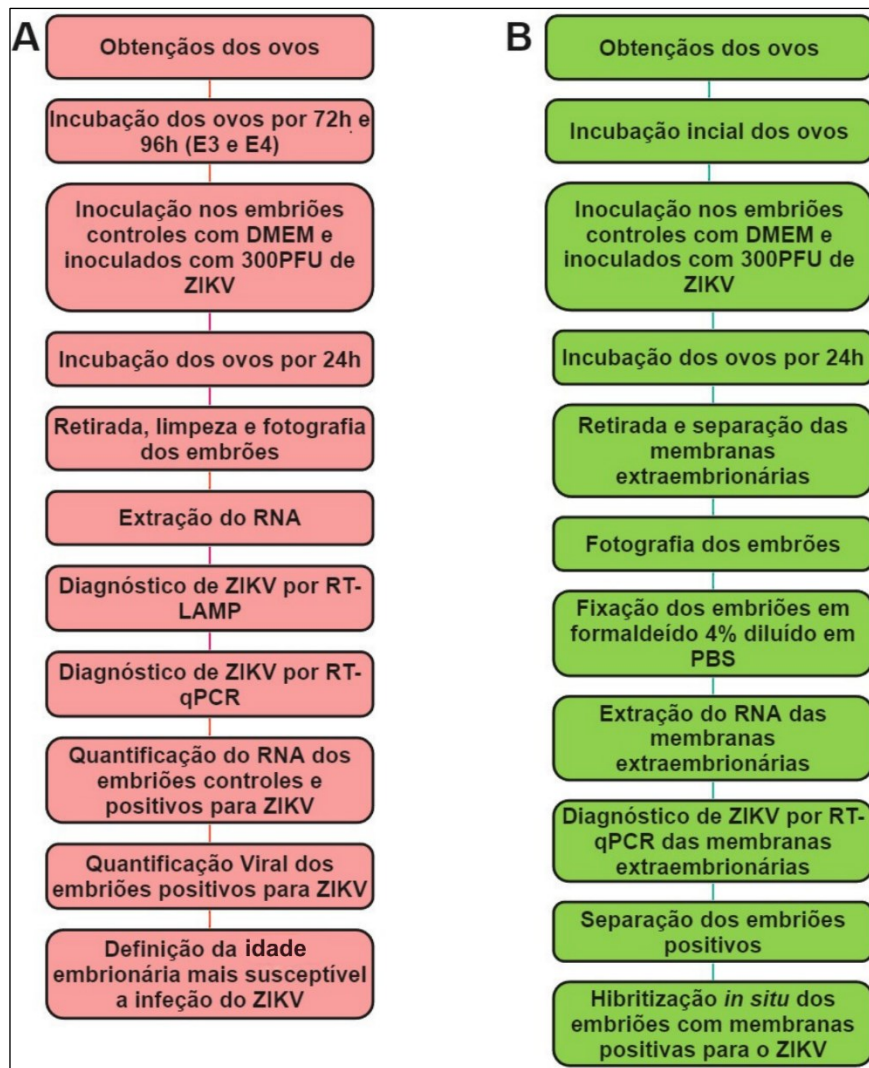
Os procedimentos realizados com embriões de *G. gallus* tiveram aprovação do Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC), com o número 6016021017, e foram executados conformes os protocolos já utilizados no Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual da UFSC (LACERT/UFSC). Os embriões inoculados com ZIKV, foram manipulados em sala com sistema de contenção com nível de biossegurança 2 (NB2), que teve a sua certificação obtida pelo Comissão Interna de Biossegurança da UFSC (CIBio/UFSC), com o código CQB101/99.

Inicialmente os ovos foram incubados a 38°C com umidade relativa do ar (UR) a 75%, por 72h ou 96h, atingindo as idades de E3 ou E4, respectivamente. Terminado esse primeiro período de incubação, os ovos foram abertos e os embriões expostos para a inoculação na região cardíaca com meio de cultura DMEM (*Dulbecco's Modified Eagle Medium* [Gibco]) nos embriões controles e 300 PFU de solução viral de ZIKV (diluídos em DMEM) nos embriões inoculados. Após inoculação do ZIKV, esses embriões foram incubados por mais 24h. Terminado o período de incubação, os embriões foram retirados dos ovos, fotografados e encaminhados para a extração de RNA do corpo inteiro.

O próximo passo foi o diagnóstico do ZIKV nos embriões pelo método de RT-LAMP, pelo seu baixo custo e praticidade, no entanto problemas metodológicos, que serão apresentados ao longo do trabalho, nos levaram a optar pelo método de RT-qPCR para todos os diagnósticos, que possibilitou além do diagnóstico, a realização de quantificação viral de cada embrião.

O passo seguinte foi desenvolver uma sonda de RNA marcada com digoxigenina (Dig) para hibridização *in situ*. Nesse ponto, no entanto, foi necessário padronizar uma outra forma de diagnosticar o ZIKV, pois para realizar a hibridização *in situ*, o embrião deve estar intacto. Foi então padronizado um método de diagnóstico através das membranas extraembrionárias. Por fim, a sonda para hibridização *in situ* pode ser testada.

Figura 7 - Desenho experimental



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Fluxograma da abordagem experimental realizada no estudo. A - Representa a primeira fase do estudo na qual o objetivo foi identificar a idade com maior carga viral. B - Segunda fase do estudo que foi o diagnóstico pelas membranas extraembrionárias e preparação dos embriões para hibridização *in situ*.

4.2 MODELO ANIMAL

Para o desenvolvimento desse estudo foi escolhido como modelo embriões de *G. gallus*. Os ovos fecundados foram doados pelo Professor Fabiano Dahlke do Laboratório de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA). A coleta dos ovos aconteceu no mesmo dia da postura. No laboratório, os ovos foram armazenados a 18°C, até a utilização nos experimentos.

4.2.1 Obtenção dos embriões de *G. Gallus*

Para obtenção dos embriões, os ovos fertilizados foram incubados na chocadeira elétrica (ChocMais) a 38°C com 75% UR. Os ovos foram divididos em dois grupos, em que um grupo experimental foi incubado por 72h (E3), correspondente ao estágio HH20. O outro grupo foi incubado por 96h (E4), correspondente ao estágio HH24 (Hamburger; Hamilton, 1951). Logo após a incubação, os embriões foram inoculados com ZIKV ou DMEM (no caso dos embriões controle), e incubados por mais 24h nas mesmas condições descritas anteriormente, e após esse período os embriões foram retirados dos ovos para análises (Figura 8 A e B).

4.3 VÍRUS DA ZIKA

O vírus utilizado para inoculação nos embriões foi da cepa ZV BR15261 com o genoma descrito no GenBank: MF073358.1. Essa cepa foi isolada do soro de um paciente do Rio Grande do Norte na região nordeste do Brasil, em março de 2015 (Strottmann *et al.*, 2019). Essa cepa foi amplificada pelo Instituto Carlos Chagas/FIOCRUZ do Paraná em Curitiba que gentilmente cedeu amostras para o desenvolvimento desse projeto.

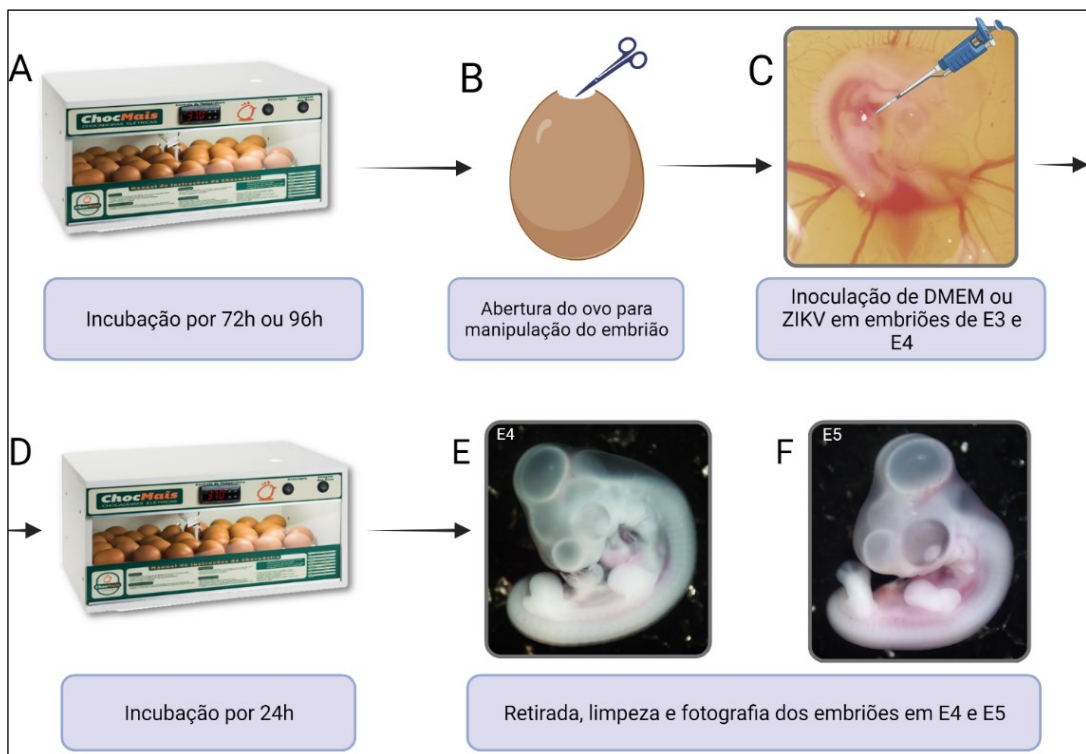
4.3.1 Inoculação de embriões de *G. gallus* com ZIKV *in ovo*

Os procedimentos utilizados para infecção foram padronizados pelo grupo e adaptados para as idades utilizadas nesse estudo (Benevenuto, 2022; Souza, 2022; Taufer, 2023). Pois, é importante que o método de infecção seja não letal para permitir análises no embrião. Todas as manipulações de inoculação ou retirada dos embriões foram realizadas em capela de fluxo laminar equipada com filtro HEPA, com auxílio de um microscópio estereoscópico (Olympus SZ61).

Em cada procedimento de inoculação do ZIKV, os embriões foram divididos em grupo controle e grupo de inoculados com ZIKV. Em cada experimento, em média cinco embriões controles foram inoculados com 3µl de solução com meio de cultura DMEM, e em média 15 embriões foram inoculados com 3µl de solução contendo 300PFU de ZIKV (Apêndice B).

Para o procedimento de inoculação foi realizada uma abertura na região da câmara de ar do ovo com uma tesoura (Figura 8 B), e realizada a retirada das membranas externas para exposição do embrião. Em seguida, foi realizada uma pequena abertura na membrana amniótica na região cardíaca e a solução viral ou DMEM foi inoculada nessa região (Figura 8 C). Após a manipulação, a abertura do ovo foi fechada com fita atóxica (Scotch, 3M) e logo em seguida os ovos manipulados foram devolvidos à incubadora, para ficar por mais 24h em 38°C com 75% UR (Figura 8 D). Após o período de incubação, os embriões foram retirados dos ovos e passaram pelo processo de limpeza que consiste na remoção de todos seus anexos embrionários (Figura 8 E e F). Terminado o procedimento de limpeza os embriões foram fotografados do lado direito e esquerdo com a câmera fotográfica (Olympus DP71) acoplada a um estereomicroscópio (Olympus MVX10) (Figura 8 E e F), com o auxílio do programa CellSens, versão 1.16 (Figura 9 A e B). Depois de fotografados, parte dos embriões foram armazenados imediatamente em ultrafreezer -80°C, para ser extraído o RNA, e parte fixados em formaldeído 4% diluídos em *Phosphate-buffered saline* (PBS 1x), para o procedimento de hibridização *in situ*.

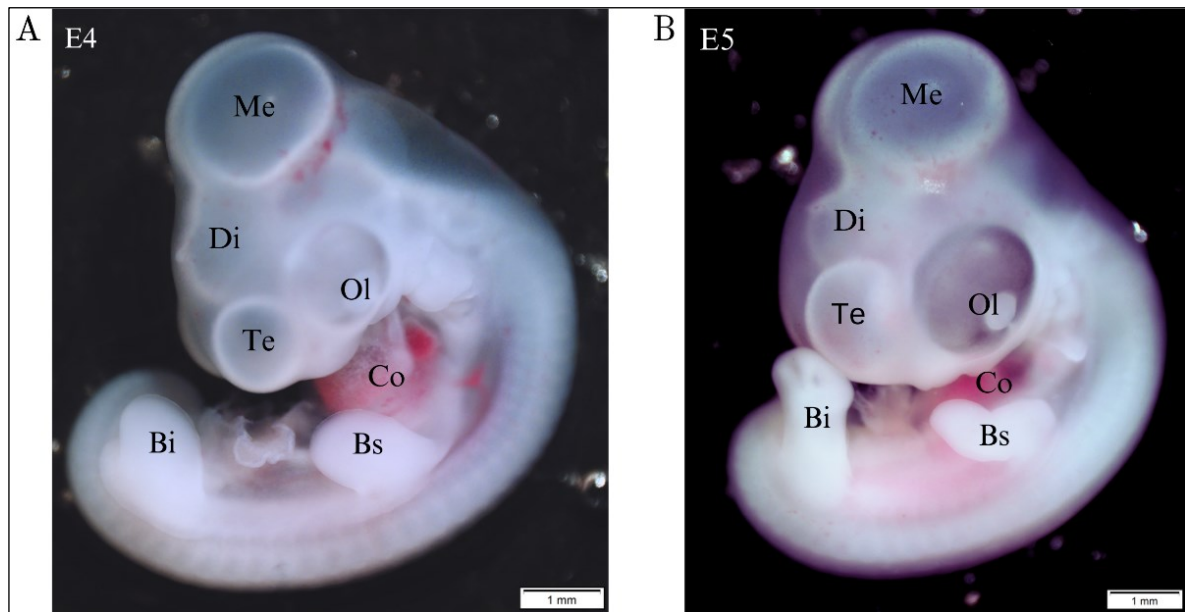
Figura 8 - Esquema de incubação e inoculação em embriões de *G. gallus* com ZIKV



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Esquema desde obtenção dos ovos, até a fotografia dos embriões para posteriores análises. A – Procedimento de incubação dos ovos pelo período de 72h ou 96h. B – Abertura na região da câmara de ar do ovo para exposição do embrião. C – Inoculação da solução contendo 300PFU de ZIKV ou meio de cultura DMEM. D – Incubação dos embriões manipulados por 24h. E – embrião não inoculados com o ZIKV em idade de E4. F - Embrião não inoculados com o ZIKV em idade de E5.

Figura 9 - Fotos realizadas dos embriões após sua retirada dos ovos pós-inoculação viral



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Exemplo de embriões não inoculados com ZIKV com 4 e 5 dias de desenvolvimento (E4 e E5). Ol = Olho, Te = Telencéfalo, Di = Diencefalo, Me = Mesencefalo, Co = Coração, Bi = Broto do membro inferior e Bs = Broto do membro superior.

4.4 EXTRAÇÃO E QUANTIFICAÇÃO DO RNA

4.4.1 Extração de RNA

A extração do RNA de cada um dos embriões inteiros foi realizada pelo método fenol-clorofórmio com o reagente *Trizol Reagent* (Invitrogen), conforme as orientações do fabricante. Os RNAs foram precipitados em isopropanol 100% a -20°C durante 18h, centrifugados à 12000g por 10 minutos, descartado o sobrenadante, acrescentado etanol 75% para lavagem do precipitado, centrifugados à 7500g por 5 minutos, descartado o sobrenadante e logo em seguida foram eluídos em 100µl de água DPEC

(Pirocarbonato de dietila). Os RNAs foram armazenados em ultrafreezer a -80°C, imediatamente após a eluição em água DEPC.

4.4.2 Qualidade e Quantificação do RNA

Todos os RNAs utilizados foram dosados por fluorimetria. O preparo do RNA para dosagem foi realizado com o *Qubit RNA BR (Broad-Range) Assay Kit* (Invitrogen), conforme protocolo do fabricante. As dosagens foram realizadas pelo equipamento *Qubit 4 Fluorometre* (Invitrogen). As amostras com concentrações de RNA abaixo da faixa de sensibilidade do kit de dosagem utilizado (inferior a 10ng), foram descartadas. As amostras que ficaram acima da faixa de sensibilidade do kit (superior a 1200ng), foram diluídos 1:200, conforme orientação do fabricante e realizada uma nova dosagem.

Para análise de qualidade do RNA foram realizados RT-qPCR para dois genes distintos. MRPS27, gene usado como referência de expressão constitutiva (obrigatoriamente tem que amplificar). Dlx5, gene cujo desenho dos *primers* permite identificar uma possível contaminação com DNA genômico (DNAg), pois o *amplicon* derivado do DNAg apresenta um *íntron*, ou seja, em caso de contaminação com DNAg o *amplicon* seria maior (Tabela 3). Esse tipo de análise permite a identificação, com alta sensibilidade, de possíveis contaminações com DNAg.

4.5 DIAGNÓSTICO DO ZIKV

4.5.1 RT-LAMP

Para a identificação do ZIKV nas amostras de RNA dos embriões, por *reverse transcription loop-mediated isothermal amplification* (RT-LAMP) foram utilizados os *primers* “FIP”, “BIP”, “F3”, “B3”, “LF” e “LB” descritos por Silva *et al.* (2021) e Song *et al.* (2016) (Tabela 1). Segundo os autores, a região de codificação da proteína do envelope foi selecionada para projetar os *primers* ZIKV RT-LAMP devido à sua alta homologia entre isolados de ZIKV e alta divergência dos outros flavivírus. Na reação de RT-LAMP, os mesmos *primers* são utilizados pela Bst 3.0 DNA Polimerase (versão 3.0 *New England Biolabs*), para transcrição reversa seguida à amplificação dos alvos.

Para cada *primer* foram feitas alíquotas (10x concentradas) contendo os primers FIP e BIP (16 μ M cada), F3 e B3 (2 μ M cada), LF e LB (4 μ M cada).

As reações de RT-LAMP foram realizadas em volume de 25 μ l por tubo contendo tampão de amplificação isotérmica 1x, 8mM de MgSO₄, 4U de Bst 3.0 DNA polimerase, 1,8mM de trifosfatos de desoxinucleotídeos (dNTPs) (Promega), 1,6 μ M de FIP, 1,6 μ M de BIP, 0,2 μ M de F3, 0,2 μ M de B3, 0,4 μ M de LF, 0,4 μ M de LB e 5 μ L de amostra com RNA extraído dos embriões inteiros em idade de E4 ou E5 (Figura 10 B). Após foi acrescentado 1 μ L de *SYBR Green I* (ThermoFisher Scientific) diluído em água livre de nuclease (Promega) na proporção de 1:10 (1000X) na tampa do tubo de reação, ou 0,2 μ L de vermelho de fenol (Bianquímica) direto na reação. As reações de RT-LAMP foram incubadas a 65°C ou 72°C durante 40 ou 60 minutos no termociclador *SimpleAmp Thermal Cycler* (ThermoFisher) (Figura 10 C), em seguida foram inativadas a 80°C durante 5 minutos.

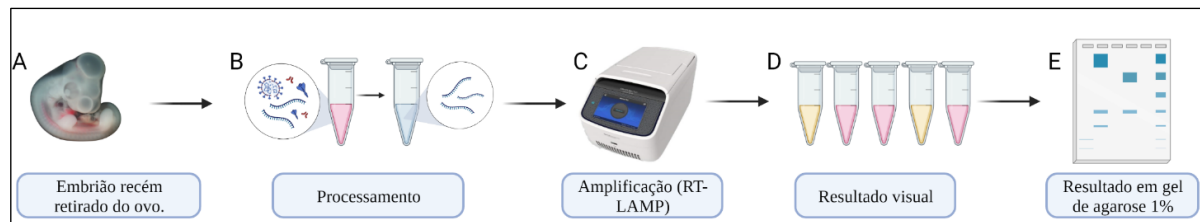
Após a incubação, os produtos do RT-LAMP foram detectados usando dois métodos diferentes confirmação dos resultados. No primeiro método, os produtos foram observados através do olho nu em luz natural e fotografados usando uma câmera convencional de celular (Poco X3 Pro [Xiaomi]). Para amostras positivas para o ZIKV que foram utilizados o vermelho de fenol era necessário a mudança de cor de rosa para amarelo, enquanto uma amostra negativa permaneceu rosa, e na utilização do SYBR era necessário cor laranja para esverdeada para identifica amostra positiva, enquanto uma amostra negativa permanece laranja (Figura 10 D). No segundo método, os *amplicons* do RT-LAMP foram analisados por eletroforese em gel de agarose (1,0%) em tampão TAE 1x, seguido de coloração com *SYBR Green I* e visualização do gel com auxílio do transiluminador (*The UVP MultiDoc-It*) (Figura 10 E).

Tabela 1 - *Primers* utilizados RT-LAMP

Primers	Sequência 5' - 3'
FIP	GGCGACATTTCAAGTGGCCAGAGAGCTCTRGAGGCTGAGA
BIP	AGGGCGTGTCATACTCCTTGTGAGTGTTCAGCCGGGATCT
F3	CAGTTCACACGGCCCTTG
B3	TGTACCTCCACTGTGACTGT
LF	CCTTCCCTTTGCACCATCCA
LB	TACCGCAGCGTTCACATTCA

Fonte: Adaptado de Silva *et al.* (2019; 2021) e Song *et al.* (2016).

Figura 10 - Esquema do processamento das amostras



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Os testes foram realizados com RNAs de embriões inteiros que foram extraídos pelo método de Fenol/clorofórmio. A - Embriões que foram retirados dos ovos e estavam congelados em ultrafreezer -80°C . B - Processamento dos embriões, como a extração dos RNAs e preparação para o teste de LAMP. C - Amplificação do trecho de interesse para o diagnóstico das amostras positivas para ZIKV. D - Resultado visual de positivos, em tubos utilizados SYBR ou vermelho de fenol. E - Confirmação do resultado por eletroforese em gel de agarose 1%.

4.5.2 RT-qPCR

As análises diagnósticas para o ZIKV foram realizadas utilizando o sistema *GoTaq® OneStep Probe RT-qPCR* (Promega) com *primers* e sondas específicas, conforme descritos na Tabela 2 (Lanciotti *et al.*, 2008). As análises foram feitas conforme os protocolos cedidos pelo Instituto Carlos Chagas /FIOCRUZ do Paraná. Para o diagnóstico de ZIKV foram realizadas reações em um volume de $10\mu\text{l}$ por poço, tendo tampão *GoTaq® Probe qPCR Master Mix, 2X* com $5\mu\text{l}$, *GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR* (50X) com $0,2\mu\text{l}$, *forward primer* (20X) com $0,5\mu\text{l}$, *reverse primer* (20X) com $0,5\mu\text{l}$, *hydrolysis probe* (20X) com $0,2\mu\text{l}$, água livre de nuclease (Promega) com $2,6\mu\text{l}$, e com $1\mu\text{l}$ da eluição do RNA extraído dos embriões inteiros em idade de E4 ou E5. A reação de RT-qPCR foi realizada no equipamento *QuantStudio3 Real-*

time PCR Systems (Thermo Fisher), com os seguintes parâmetros: 50°C por 30 minutos e 95°C por 15 minutos para realização da transcrição reversa. Na segunda etapa foram realizados 45 ciclos de quantificação (Cq) com temperatura de 95°C por 15 segundos e 60°C por 60 segundos. Após esse processo as análises dos resultados foram realizadas com o programa *Design & Analysis Software* versão 1.5.2. Embriões que apresentam Cq com um número igual ou maior a 38 foram considerados negativos e descartados.

Tabela 2 - *Primers* e sonda utilizado para diagnóstico e quantificação do ZIKV e produção da sonda de hibridização *in situ*

Primers/Sonda	Sequência 5' - 3'	Promotor
ZIKV 1086 ¹	CCGCTGCCCAACACAAG	-
ZIKV 1162c ¹	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT	-
ZIKV 1107-FAM ¹	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA	-
ZIKV_T3 Probe S ²	GGTGGGACTTGGGTTGATGT	T3 - AATTAACCCCTCACTAAAG
ZIKV_T7 Probe AS ²	ATGTCACCAGGCTCCCTTTG	T7 - TAATACGACTCACTATAG

Fonte: ¹ Adaptado de Lanciotti *et al.* (2008). ² Elaborado pelo autor.

Legenda: *Primers* utilizados no diagnóstico do ZIKV e produção da sonda para hibridização *in situ*. Os primers ZIKV_T3 e ZIKV_T7 tiveram uma sequência de promotores adicionados junto conforme mostrado na tabela.

4.5.2.1 Análise de expressão dos genes de referência MRPS27 e DLX5

Para as análises dos genes de referência foi utilizado o sistema *goTaq® OneStep RT-qPCR* (Promega), com *primers* específicos para os genes MRPS27 e DLX5 descritos na Tabela 3 (Souza, 2022; Taufer, 2023). As reações foram realizadas com volume de 10µl por poço, tendo tampão *GoTaq® Probe qPCR Master Mix*, 2X com 5µl, *GoScript™ RT Mix for 1-Step RT-qPCR* (50X) com 0,2µl, *forward primer* (20X) com 0,4µl, *reverse primer* (20X) com 0,4µl, 3µl de água livre de nuclease (Promega) e 10ng do RNA extraído dos embriões inteiros em idade de E4 ou E5. Logo após esse processo, a placa foi colocada no equipamento *QuantStudio3 Real-time PCR Systems* (Thermo Fisher), incubados por 37°C por 15 minutos e 95°C por 10 minutos. Após esse tempo o próximo passo foi a fase de amplificação em 40 ciclos de quantificação de 95°C por 10 segundos, 61°C por 30 segundos e 72°C por 30 segundos. Após finalizada a fase de amplificação, o equipamento fez a *melt curve*,

que acontece em um ciclo único de 95°C por 15 segundos, 60°C por 60 segundos e 95°C por 1 segundos. Terminado esse processo as análises dos resultados foram realizadas com o programa *Design & Analysis Software* versão 1.5.2. Embriões que apresentam Cq com um número igual ou maior que 38 foram considerados negativos e descartados.

Tabela 3 - *Primers* utilizados para expressão de genes de referência

Gene	Sequência Sense (5' - 3')	Sequência Anti-Sense (5' - 3')	RNA (pb)	DNAg (pb)
Dlx5	GCCCCTACCACCAGTACGGA	CGCGGTGCGCACTTTCTT	127	961
Mrps27	TAACCCTGACCACCCAACCTC	GCTTGTTCTTGCTCCCCTC	103	103

Fonte: Elaborado por Souza (2022) e Taufer (2023).

Legenda: pb = Pares de bases.

4.6 QUANTIFICAÇÃO RELATIVA DO ZIKV - RT-QPCR

Para a quantificação relativa de ZIKV nos embriões foi realizado RT-qPCR para ZIKV (Tópico 4.4.3.1), mas aqui utilizando uma curva de diluição de RNA de ZIKV com concentração conhecida (doada pelo Professor Dr. Daniel Santos Mansur MIP/UFSC). Essa curva foi elaborada com cinco pontos e fator de diluição 1:10 entre cada um dos pontos. Cada poço da curva recebeu os mesmos volumes e concentrações dos reagentes citados no tópico 4.5.2, para diagnóstico de ZIKV. O cálculo da carga viral foi realizado por regressão linear, comparando o Cq obtido na RT-qPCR para cada embrião e a curva obtida dos Cq correspondentes à leitura dos RNAs com concentração de ZIKV conhecidas.

Considerando a variação natural no tamanho dos embriões, para uma quantificação mais precisa, os valores obtidos foram divididos pela quantidade de RNA total extraído de cada embrião. Dessa forma, todos os resultados de quantificação da carga viral do ZIKV nos embriões foram expressos na forma de RNA viral/RNA total do embrião.

4.7 HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* EM EMBRIÕES DE *G. GALLUS*

4.7.1 Produção da sonda de RNA marcado com digoxigenina para hibridização *in situ*

As sondas de RNA, marcadas com dig, para hibridização *in situ* foram produzidas por transcrição *in vitro*, utilizada como molde sequências específicas do genoma do ZIKV (ZV BR 15261), amplificadas por PCR (Creuzet, *et al.*, 2002; Henrique *et al.*, 1995). Os *primers* utilizados estão descritos na Tabela 2. A esses *primers* foram adicionadas as sequências de promotores para a RNA polimerase T3 – *primer sense* e T7 *primer anti-sense*. O produto do PCR (*Amplicon*) foi purificado usando kit comercial *Wizard® SV Gel and PCR CleanUp System* (Promega). O *Amplicon* purificado foi dosado por espectrofotometria com o equipamento *NanoVue Plus Spectrophotometer* (General Electric) e foi utilizado para síntese de sonda de RNA marcada com dig, utilizando o kit comercial *DIG RNA Labeling* (Roche), conforme orientações do fabricante. Ao final do processo, a sonda foi purificada utilizando precipitação com etanol 70% a -20°C durante 18h e solubilizada em água livre de nucleases (Promega), e dosado pelo equipamento *Qubit 4 Fluoromete* (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. Após o processo de dosagem a sonda foi misturada ao mix de hibridização.

4.7.2 Hibridização *in situ*

Para a realização da hibridização *in situ*, os embriões foram fixados por 24 horas em formaldeído 4% em PBS a 4°C, em seguida foram desidratados em séries de metanol/PBS a 50% e 100% na sequência reidratados em uma série de metanol/PBS a 75%; 50%; 25% e PBT (PBS 1x + 0,01% de Tween20). Os embriões foram então permeabilizados com proteinase K (Roche) 10µg/ml em PBT e pós-fixados com formaldeído 4% + glutaraldeído 0,1% em PBT por 20 minutos. Os embriões foram pré-hibridizados em tampão de hibridização (formamida 50%, EDTA 5mM, RNA de levedura 50µg/ml, Tween20 0,4%, CHAPS 0,5%, heparina 100µg/ml e tampão SSC 1,5X) e PBT em uma concentração de 1:1 até tombarem ao fundo do tubo, seguido de outra incubação com tampão de hibridização puro até tombarem ao

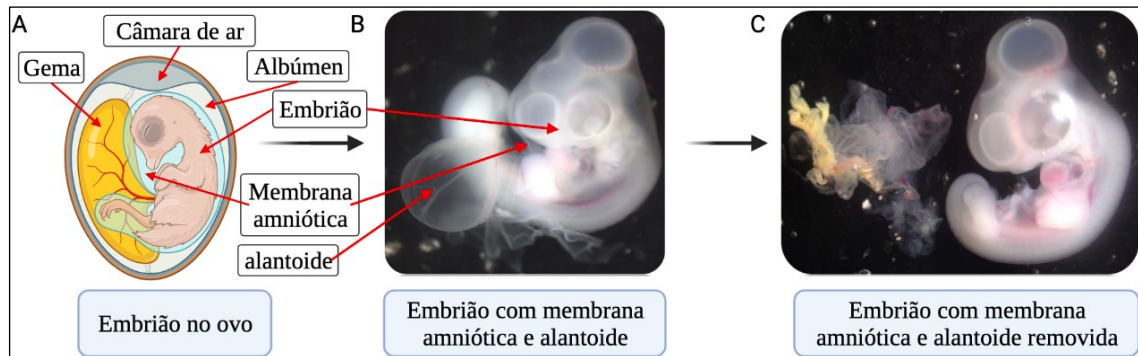
fundo novamente, seguida de uma incubação a 70°C com o tampão de hibridização por no mínimo 1 hora.

A hibridização foi realizada durante toda a noite a 70°C em tampão de hibridização, acrescentando-se 0,3µg/ml da sonda de RNA direcionada para o ZIKV (ver tópico 4.7.1), previamente preparadas e marcadas com dig conforme descrito por Creuzet *et al.* (2002) e Henrique *et al.* (1995). Após o período de hibridização, foram realizadas cinco lavagens em tampão de hibridização a 73°C, seguidas por quatro lavagens realizadas em tampão MABT (água, NaCl 5M 3%, ácido maleico 2M 5% e NaOH 10N a 2%). Na sequência, os embriões foram imersos em solução de bloqueio com MABT, *Blocking reagent* 10% (Roche) e SBF 20% (soro bovino fetal) por 2 horas. Imediatamente após, os embriões foram incubados com anticorpo secundário anti-digoxigenina (anti-DIG) a 4°C por 12 horas. No dia seguinte, cinco lavagens foram realizadas em tampão MABT, seguidas de duas lavagens no tampão NTM (Tris 1M 10%, NaCl 5M 2%, MgCl₂ 2M 2,5%, Tween20 0,005% e água Milli-Q), seguidas da revelação com solução de *nitro blue tetrazolium chloride* (NBT) a 33,75µg/ml e *5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt* (BCIP) a 175µg/ml em NTM.

4.8 DIAGNÓSTICO DO ZIKV PELAS MEMBRANAS EXTRA EMBRIONÁRIAS

Como uma alternativa para diagnosticar o ZIKV, mantendo os tecidos embrionários intactos para outras análises, foi testada a possibilidade de identificar a presença do ZIKV nas membranas extraembrionárias. Para esses testes foram utilizadas as membranas amnióticas e alantoide (membranas extraembrionárias) (Figura 11). Esses anexos embrionários foram separados dos embriões, e armazenados em ultrafreezer -80°C. Após esse processo foram realizadas a extração do RNA desses tecidos e realizado o RT-qPCR para diagnosticar o ZIKV.

Figura 11 - Separação da membrana amniótica e alantoide dos embriões



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: As membranas retiradas dos embriões para diagnóstico de ZIKV em idade de E4. A – Modelo de embrião no ovo e principais partes anatômicas utilizadas no estudo. B - Embrião retirado do ovo ainda com a membrana extraembrionárias. C - Embrião com as membranas separadas.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

Foram realizadas as análises estatísticas dos resultados utilizando o *software GraphPad Prism*, versão 9.2.0. A análise *outliers* nos embriões não foi realizada pois a variação da carga viral é muito grande em cada embrião, por esse motivo foi considerado a utilização de todos os embriões positivos para ZIKV.

O teste de normalidade dos dados foi realizado utilizando o teste de Shapiro-Wilk e o teste de Kolmogorov-Smirnov como confirmação. Os dados obtidos nesse estudo não tiveram resultado positivo para normalidade em nenhum dos dois testes, então para as análises de comparação entre os grupos foi realizado o teste de Kruskal-Wallis que é utilizado para dados não paramétricos sendo utilizada a mediana e o intervalo interquartil.

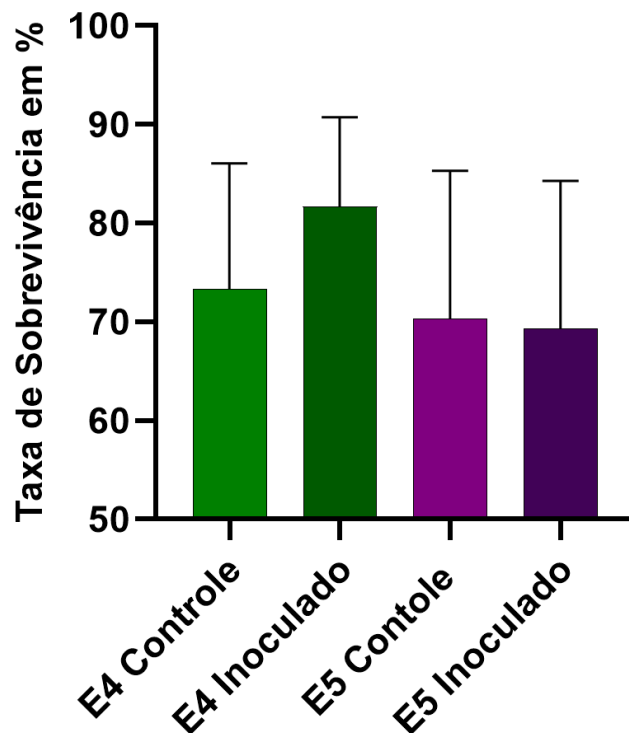
A correlação entre duas variáveis foi avaliada por meio do teste de correlação Spearman, utilizado em dados que não apresentam distribuição normal. Em seguida, foi realizada uma análise de regressão linear simples. Foram considerados resultados estatisticamente significativos aqueles que o valor de p foi igual ou inferior a 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 INFECÇÃO PELO ZIKV VIA REGIÃO CARDÍACA NÃO AFETA A SOBREVIVÊNCIA DE EMBRIÕES DE *G. GALLUS*

Nesta primeira etapa do trabalho foi verificado os índices de sobrevivência dos embriões de *G. gallus* infectados com ZIKV, via inoculação na região dos cardíaca. Os embriões inoculados com ZIKV apresentaram a taxa de sobrevivência variando cerca de 10% entre as idades de E4 e E5 (Figura 12). O método de infecção utilizado nesse trabalho em embriões E4 e E5 não mostrou diferença significativa no índice de sobrevivência dos embriões, nem entre as duas idades analisadas, e também em relação ao método anteriormente utilizado pelo grupo (Apêndice A). Isso valida a técnica e permite a utilização desses dados em conjunto, comparando-os entre si.

Figura 12 - Taxa de sobrevivência dos embriões inoculados



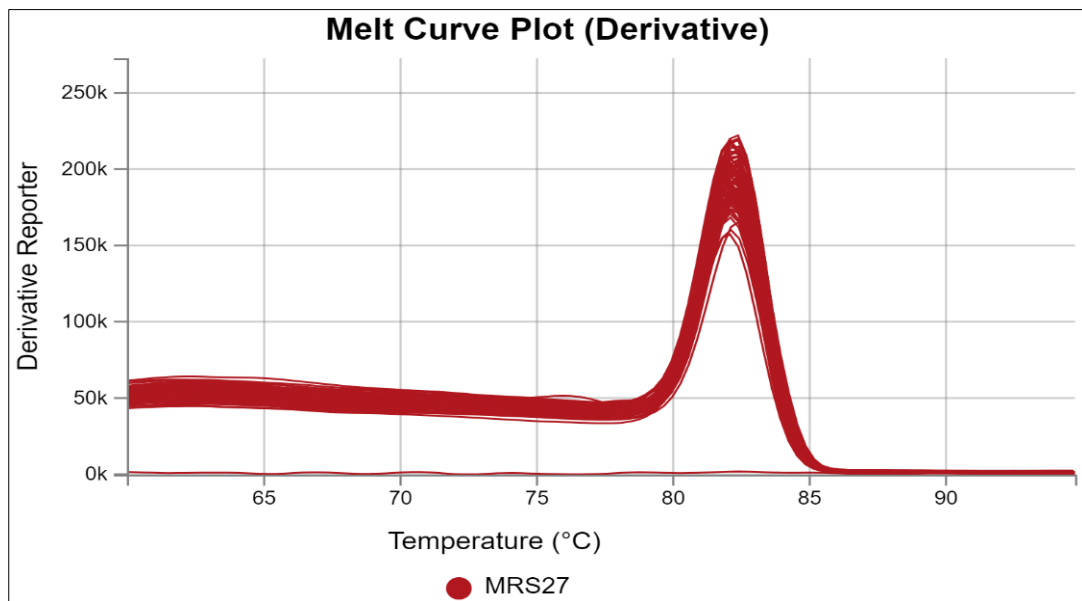
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Análise entre os grupos de embriões vivos no processo de inoculação. As análises entre os grupos não apresentaram significância estatística. $p = 0,3849$.

5.2 RNAS EXTRAÍDOS DE EMBRIÕES INOCULADOS COM ZIKV

O diagnóstico do ZIKV em tecidos embrionários é bastante delicado. O número de partículas virais utilizadas no procedimento é relativamente baixo. Para que os diagnósticos de ZIKV sejam precisos e confiáveis, é necessário que a qualidade do RNA seja testada. Para isso foi utilizado dosagens de RNA realizadas por espectrofotometria, seguido de teste da qualidade desses RNA por RT-qPCR para o *Mrps27*, uma proteína constitutiva expressa por todos os tecidos embrionários. Na Figura 13 é possível observarmos uma sobreposição das *melt curve*, todas apresentando um pico único. Isso mostra que os RNAs com os quais esse RT-qPCR foi realizado estão íntegros, pois picos múltiplos são sinais de fragmentação, primers inespecíficos, ou contaminação (Nascimento *et al.*, 2015).

Figura 13 - *Melt curve* do gene *Mrps27*



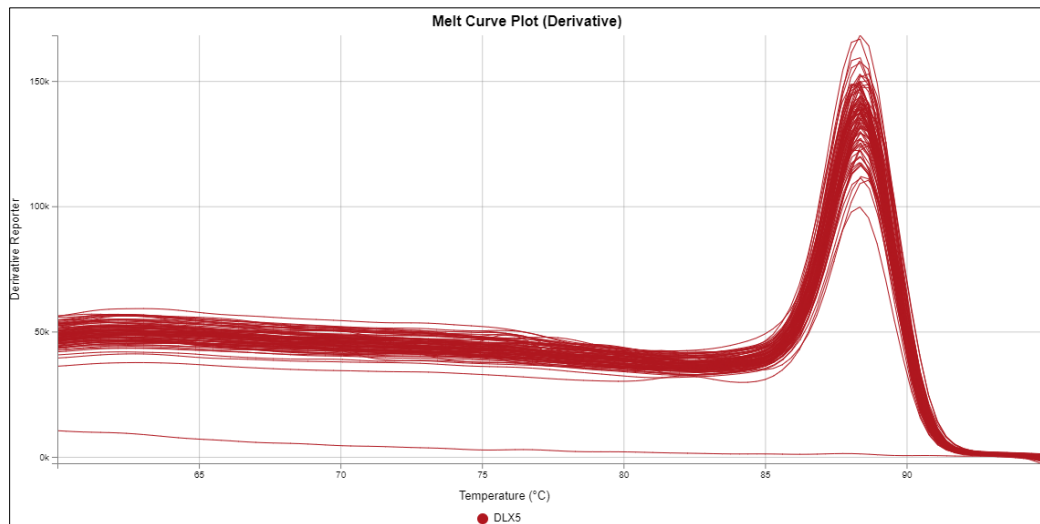
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Análise de RT-qPCR da expressão do gene *Mrps27*, em todos os embriões controles e infectados com ZIKV, com todas as amostras com pico único, apenas o controle negativo para o gene não apresentando pico.

A segunda análise realizada nesses RNAs visa identificar possíveis contaminações da amostra de RNA com DNAg. Para isso foi realizada reação de RT-qPCR para *Dlx5*, pois o *primer* para esse gene foi desenhado de forma a contemplar uma região de *intron* entre eles. Sendo assim, possíveis contaminações com DNAg

seria facilmente identificada pela presença de picos duplos na análise da *melt curve*. Como é possível observar na Figura 14, todos os RNA apresentaram apenas um pico sobreposto. Esses resultados mostram que os RNAs utilizados estavam íntegros e sem contaminação de DNAG, sendo viáveis para as análises seguintes.

Figura 14 - *Melt curve* do Gene Dlx5



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Análise de RT-qPCR da expressão do gene Dlx5, em todos os embriões controles e infectados com ZIKV, com todas as amostras com pico único, apenas o controle negativo para o gene não apresentando pico.

5.3 DIAGNÓSTICO DE ZIKV POR AMPLIFICAÇÃO ISOTÉRMICA MEDIADA POR LOOP DE TRANSCRIÇÃO REVERSA (RT-LAMP)

A RT-LAMP é uma técnica de biologia molecular que torna possível realizar diagnósticos moleculares, de forma fácil, rápida, com alta sensibilidade e valor menor que os kits de diagnósticos moleculares por RT-qPCR, amplamente utilizados. Com poucos materiais no laboratório já é possível obter os resultados com sensibilidade comparável ao RT-qPCR (Notomi *et al.*, 2000; Thompson; Lei, 2020).

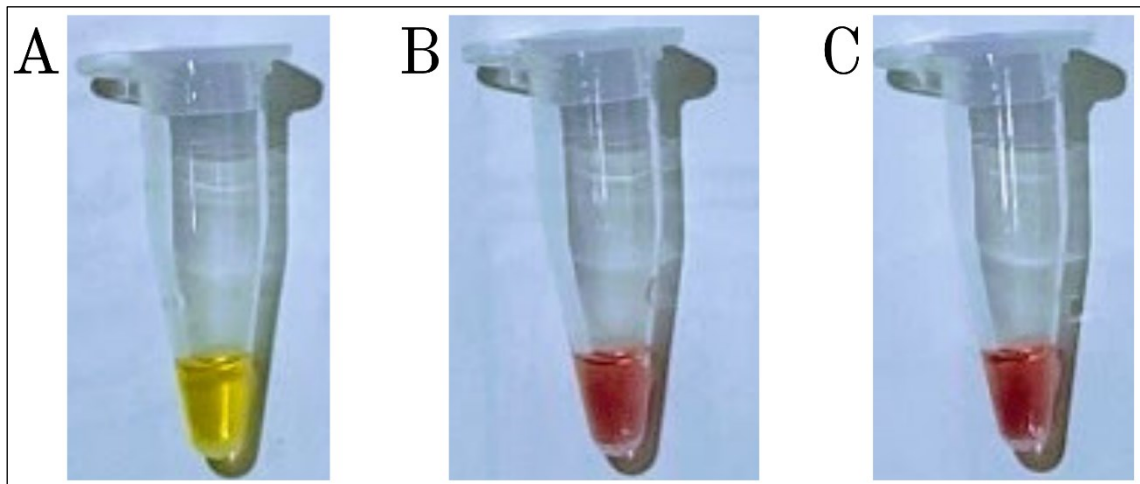
5.3.1 Teste dos *primers* utilizados para RT-LAMP

Diferente do RT-qPCR ou RT-PCR convencional, a RT-LAMP exige um conjunto de *primers* com anelamento complexo (Tabela 1). Para reduzir o número de variáveis, realizamos os testes desses *primers* utilizando um RNA sabidamente

positivo para ZIKV e um kit comercial previamente padronizado pelo laboratório da Dra. Luísa Rona Pitaluga (gentilmente doado) - *WarmStart Colorimetric LAMP 2X Master Mix* (New England Biolabs).

Os testes foram realizados em triplicada, com uma amostra já conhecida como positiva para ZIKV (Figura 15 A), uma amostra de RNA negativa para ZIKV (Figura 15 B), e uma amostra sem RNA (Figura 15 C). A amostra positiva teve resultado confirmado pelo teste do RT-LAMP e as amostras negativa não apresentam mudança de cor, mostrando que os *primers* utilizado para as análises estavam funcionando, e não apresentam problemas para o diagnóstico em embriões inoculados com ZIKV.

Figura 15 - Teste de validação dos *primers* para diagnóstico do ZIKV



Fonte: Elaborado pelo autor.

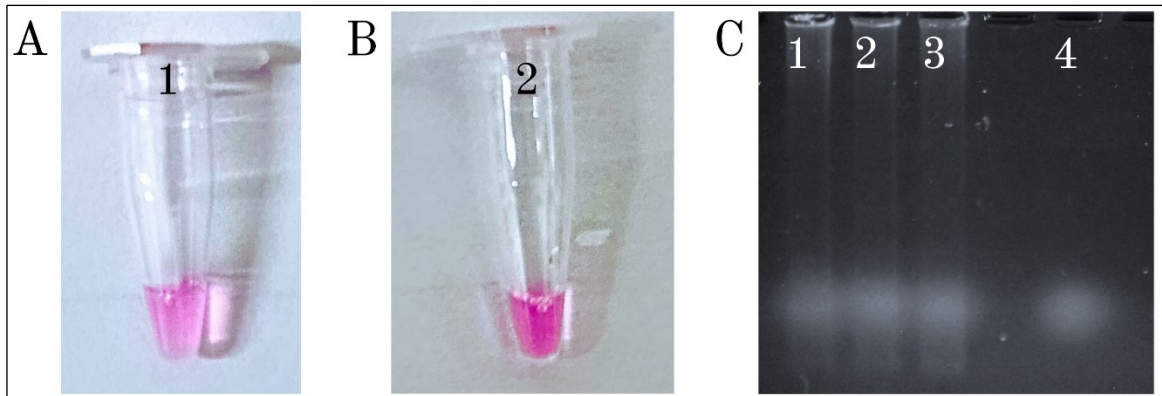
Legenda: A – Amostra com RNA positivo para ZIKV. B – Amostra com RNA negativo para ZIKV. C – Amostra controle sem RNA.

5.3.2 Diagnóstico de ZIKV por RT-LAMP

Confirmado que os *primers* desenhados para RT-LAMP estavam funcionando, a próxima etapa foi testar o kit que seria utilizado nas nossas amostras. Para isso, foi escolhido um kit que, segundo o fabricante, apresentava capacidade dupla de transcrição reversa e amplificação (Bst 3.0 DNA Polimerase [versão 3.0 *New England Biolabs*]). No entanto, quando realizado os testes com os RNAs das mesmas amostras utilizadas para o teste dos *primers*, os resultados foram negativos, mesmo para a amostra sabidamente positiva, como visto na Figura 16. Para verificar se as amostras

realmente não haviam amplificado, além do teste colorimétrico, (Figura 16 A e B) foi realizado uma eletroforese do produto do RT-LAMP (Figura 16 C). Foi constatado que o teste realmente era negativo. Na sequência foram realizados inúmeros testes como uso diferente temperaturas (de 65°C a 72°C), diferentes tempos de incubação (de 30 a 60 minutos), como sugerido nos protocolos do fabricante, porém todos sem sucesso. Para verificar se as amostras não estavam com os RNAs degradados, foram utilizadas outras amostras também sabidamente positivas para o ZIKV, porém os resultados permaneceram negativos.

Figura 16 - RT-LAMP para diagnóstico do ZIKV



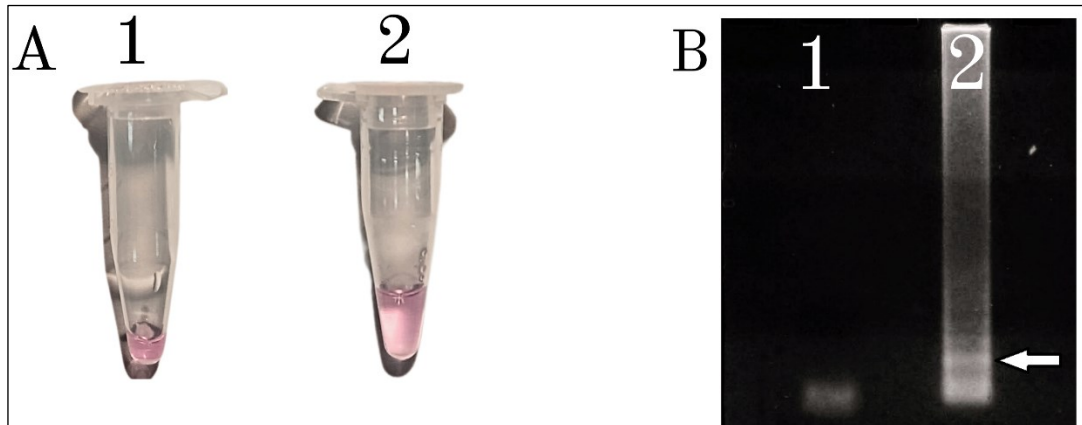
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A – Reação de RT-LAMP com amostra positiva para ZIKV. B - Reação de RT-LAMP com amostra negativa para ZIKV. C - Eletroforese dos produtos da reação de RT-LAMP. 1 - Amostra controle Positivo, 2 - Controle negativo com embrião negativo. 3 - Controle negativo com Mix de RT-LAMP com Água, 4 - Água no Lugar do mix com SYBR.

Após inúmeros testes realizados sem sucesso e, apesar do fabricante afirmar que o kit *Bst 3.0 DNA Polimerase* (versão 3.0 [*New England Biolabs*]) apresenta atividade de transcriptase reversa, realizamos um novo teste, adicionando RT extra (*GoScript™ Reverse Transcriptase* - Promega) à solução do RT-LAMP para o diagnóstico do ZIKV. Na primeira análise visual o resultado desse teste pareceu negativo (Figura 17 A), porém quando realizado a eletroforese do produto da RT-LAMP, foi possível observar os produtos típicos da amplificação nesta técnica (Figura 17 B), mostrando que a enzima *Bst 3.0 DNA Polimerase* (versão 3.0 [*New England Biolabs*]) realiza a amplificação, mas sua atividade RT é insuficiente para a realização do RT-LAMP, contrariando o que descreve o fabricante. Dessa forma, a única opção para utilizarmos RT-LAMP no diagnóstico do ZIKV seria acrescentando transcriptase

reversa extra, o que tornaria o processo mais caro, pois acrescentaria em torno de R\$ 6,80 a mais em cada reação (preço cotado em 2022). Sendo assim, alternativamente, resolvemos utilizar o RT-qPCR para os diagnósticos de ZIKV em embriões, com o protocolo adaptado utilizado no laboratório.

Figura 17 - RT-LAMP em com enzima de transcrição reversa



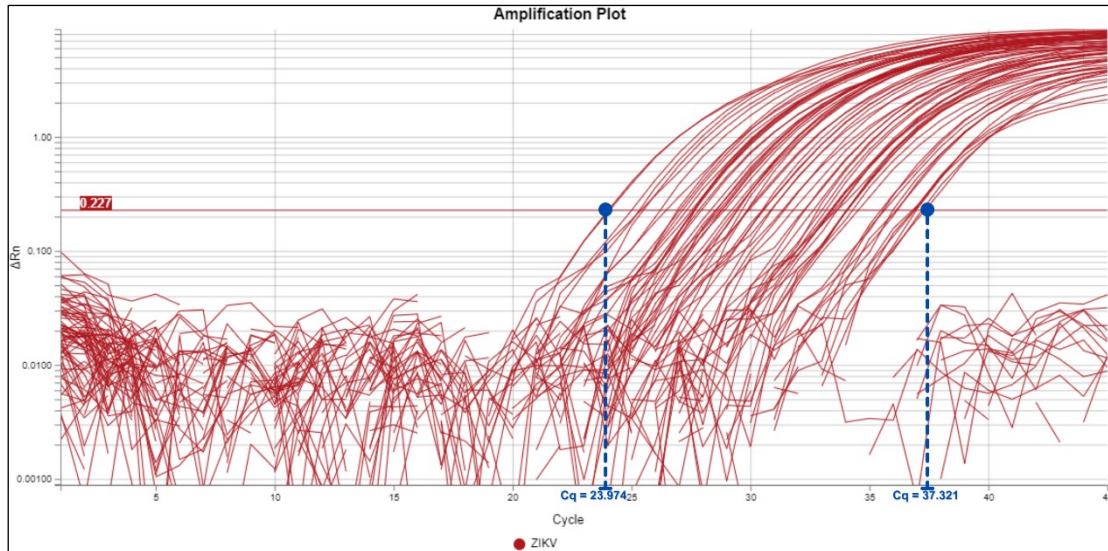
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A – Imagens da reação de RT-LAMP. B – Imagens do gel realizado com o produto da RT-LAMP da imagem A. 1 – Reação conforme o protocolo do fabricante. 2 – Reação utilizando o protocolo do fabricante com adição da *GoScript™ Reverse Transcriptase*.

5.4 ZIKV INFECTA EMBRIÕES DE *G. GALLUS* COM EFICIÊNCIA VARIÁVEL, CONFORME A IDADE

Para reduzir custos, inicialmente todos os embriões foram submetidos ao diagnóstico do ZIKV sem dosagem do RNA. Após o diagnóstico inicial foram separados os embriões positivos e negativos (Figura 18). Num segundo momento, apenas os embriões positivos para o ZIKV, tiveram o RNA dosado, para que a carga viral fosse determinada com precisão. Nos resultados do diagnóstico, é possível observar uma grande diferença na amplificação para ZIKV, com Cq variando de 23,974 a 37,321 (Figura 18). Após calcular, as eficiências de infecção, variaram de 33,30% em E4 e 78,78% em E5 isso mostra que o padrão de infecção é nitidamente variável dependendo a idade do embrião, apresentando significativa diferença estatística entre os grupos (Figura 19).

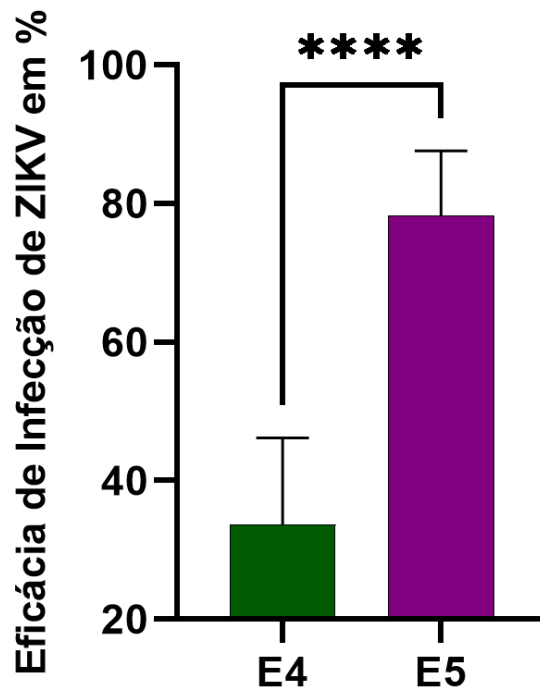
Figura 18 - RT-qPCR diagnóstica para ZIKV dos embriões em idade de E3 e E4.



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: As amostras positivas para o ZIKV (embriões E4 e E5), são aquelas que amplificaram com a subida no gráfico, as amostras que não apresentam a subida, eram os embriões controles ou aqueles que não apresentaram resultados positivos. Como a quantidade de vírus em cada embrião é relativa e muito variável, o gráfico de amplificação fica espalhado, mostrando a variedade de Cq nos embriões positivos que variou de 23.974 à 37.231.

Figura 19 - Eficácia de infecção em embriões inoculados com 300PFU de ZIKV



Fonte: Elaborado pelo autor.

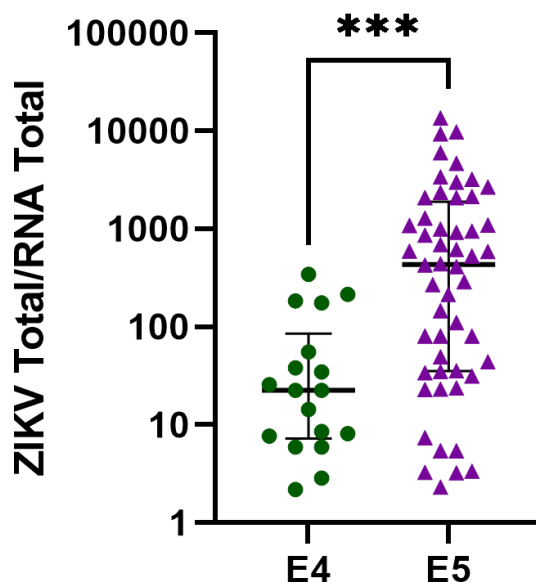
Legenda: Eficácia no sucesso de infecção dos embriões inoculados com ZIKV. $p < 0,0001$.

5.5 A EFICIÊNCIA DA REPLICAÇÃO DO ZIKV É DEPENDENTE DA IDADE DO EMBRIÃO DE *G. GALLUS*

Após confirmada a infecção pelo ZIKV nos embriões, foi determinada a carga viral de cada embrião. Porém pela variação natural do tamanho de cada embrião, foi necessário realizar a normalização da carga viral obtida. A normalização foi calculada realizando a divisão da carga viral total pela quantidade total de RNA extraído de cada embrião.

Após os cálculos de normalização foi observado que os embriões em idade de E5 apresentaram carga superior de ZIKV em comparação as outras idades analisadas, sendo a carga viral aproximadamente 19.3 vezes maior que os embriões de E4 (Figura 20). Esse aumento surpreendente de ZIKV nos embriões E5 levanta algumas dúvidas, entre elas, se o aumento no sucesso replicativo do ZIKV estaria relacionado a alguma região/tecido embrionário específico em que o ZIKV tem maior tropismo. No entanto, para realizar esse tipo de avaliação seria necessário um método diagnóstico que não comprometesse o tecido embrionário.

Figura 20 - Quantificação viral dos embriões infectados com ZIKV e com diagnóstico positivo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Gráfico da quantificação viral dos embriões analisados. $p = <0,0001$.

5.6 A QUANTIDADE DE ZIKV PRESENTE NAS MEMBRANAS EXTRAEMBRIÓNICAS ESTÁ CORRELACIONADA À CARGA VIRAL DO EMBRIÃO

O método do RT-qPCR mostrou-se extremamente preciso e eficiente para o diagnóstico do ZIKV, no entanto, os testes realizados até aqui exigem que o tecido embrionário seja dissociado por completo, impedindo outros tipos de análises nesses embriões. Na tentativa de criar um método diagnóstico que preserve o tecido embrionário, foi levantada a hipótese que as membranas extraembrionárias seriam positivas para o ZIKV. Diante disso, foram realizados os testes para a confirmação dessa hipótese e além de que também foram testados se a carga viral das membranas extraembrionárias teria correlação com a carga viral de seus respectivos embriões. Para isso, foi necessário a separação das membranas de seus embriões, seguido de testes individuais para ZIKV em cada uma dessas membranas, e embriões (Figura 11). Todas as membranas referentes aos embriões positivos para ZIKV utilizadas tiveram resultado positivo como visto na Tabela 4, e os grupos não apresentaram diferença estatística quando comparado entre si (Apêndice D).

Tabela 4 - Embriões inteiros e membranas positivas para ZIKV

Amostra	Cq do Embrião	ZIKV/RNA total dos embriões	Cq da Membrana	ZIKV/RNA total das membranas
Z41	28,685	993,6955	28,81	240,7761
Z42	36,815	3,281697	33,536	38,10474
Z44	27,591	2143,512	34,181	88,16321
Z46	27,46	2350,201	27,983	2413,036
Z47	32,629	62,17321	28,987	59,86089
Z48	34,047	22,9536	36,644	1,07193
Z49	33,42	35,66169	34,253	19,55883
Z412	33,441	35,13929	35,608	30,6561

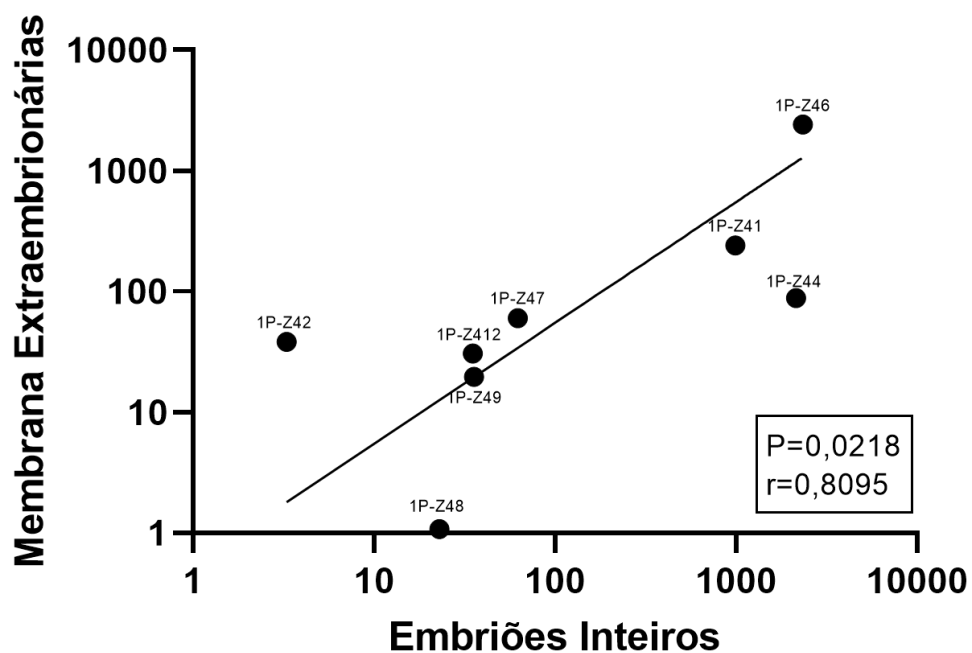
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Embriões em idade de E5, que foram separados os corpos inteiros e as membranas extraembrionárias para análise, diagnóstico e comparação da carga viral. Observa-se a carga viral dos embriões e suas respectivas membranas, assim como o valor do Cq.

Após confirmada o diagnóstico positivo para ZIKV das membranas extraembrionárias, foi realizada a quantificação de ZIKV dessas membranas e dos respectivos embriões (Tabela 4). Depois disso, foram realizadas análises de correlação, para verificar se o diagnóstico das membranas poderia ser utilizado como um indicativo da carga viral do embrião. Ainda que o número amostral do teste tenha sido pequeno (por limitações técnicas - falta de ovos embrionados), os resultados

foram promissores, pois é possível observar uma correlação forte entre a carga de ZIKV das membranas e dos embriões (Figura 21) (Callegari-Jacques, 2003 p.90; Yan, Zhihong *et al.*, 2019). Esses dados possibilitam que o diagnóstico e estimativa de carga viral sejam realizadas em embriões preservando o tecido embrionário. Isso permite, por exemplo, a localização dos sítios de infecção do ZIKV, ou ainda alterações na expressão de determinados genes de forma localizada.

Figura 21 - Correlação das membranas amnióticas, alantoide com embriões inteiros positivos para ZIKV



Fonte: Elaborado pelo autor.

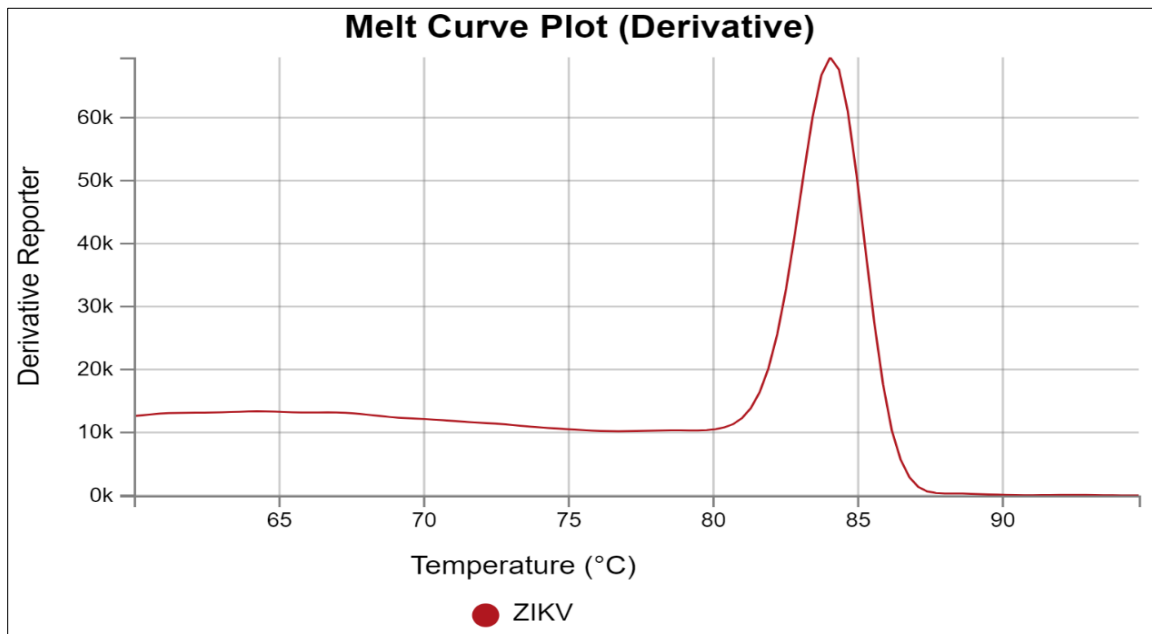
Legenda: Correlação de Spearman realizada entre o valor de quantificação viral das membranas extraembrionárias e a quantificação viral dos embriões inteiros em idade de E5.

5.7 LOCALIZAÇÃO DO ZIKV NA CABEÇA DOS EMBRÕES POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Para localizar os sítios de infecção do ZIKV nos embriões de *G. gallus*, a técnica escolhida foi a hibridização *in situ*, pela sua capacidade de marcar RNA em tecidos e estruturas inteiras. Porém o primeiro passo do processo é a produção de uma sonda de RNA específica para ZIKV. Para a isso foi necessário selecionar a região do genoma do vírus, onde seriam desenhados os *primers*. Essa região deve ser específica para o ZIKV, não reconhecendo outros flavivírus. A região do genoma

do vírus escolhida foi a 44-63 e 322-341 (Região da Glicoproteína do ZIKV). Em seguida, ao desenho do *primers* foram adicionados as sequencias de reconhecimento da T7 e T3 RNAs polimerases (Tabela 2). Ao realizar o RT-qPCR de uma amostra sabidamente positiva para ZIKV, foi verificado que o par de *primers* apresentou anelamento em apenas uma região (Figura 22).

Figura 22 - *Melt curve* da RT-PCR para avaliar os primers da produção da sonda de hibridização *in situ*

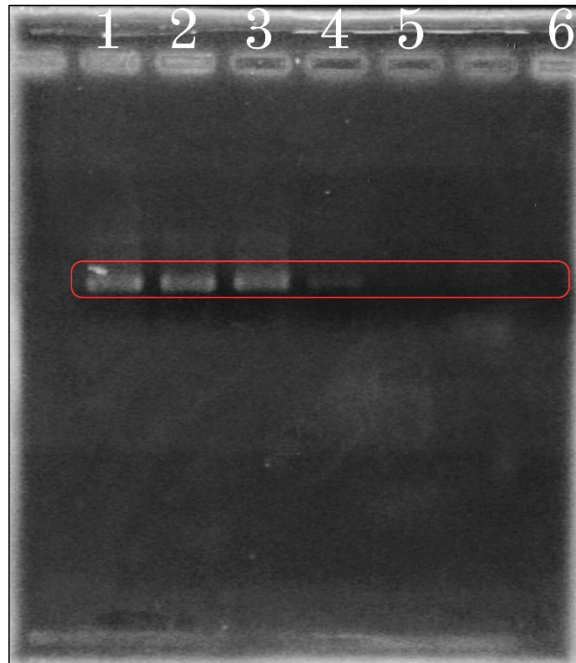


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Análise de RT-qPCR dos *primers* desenhados para sondas, a presença de um pico único na *melt curve*, mostrando que não há interação com regiões inespecíficas do RNA viral e do embrião.

Para confirmar a especificidade dos *primers*, foi realizada uma eletroforese do produto de PCR. Para isso foi realizada uma série de diluições seriadas do produto de PCR em 1:10, junto a um controle negativo (Figura 23). Os resultados obtidos foram a presença de única banda nos quatro poços com as concentrações maiores do *amplicon*. Isso mostra que foi amplificado apenas a região do genoma do ZIKV de interesse para a produção da sonda.

Figura 23 - Gel da RT-PCR da sonda ZIKV de hibridização *in situ*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Diluições seriada 1:10 do produto de RT-PCR para produção da Sonda ZIKV. 1 - 1:1, 2 - 1:10, 3 - 1:100, 4 - 1:1000, 5 - 1:10000, 6 - Controle negativo.

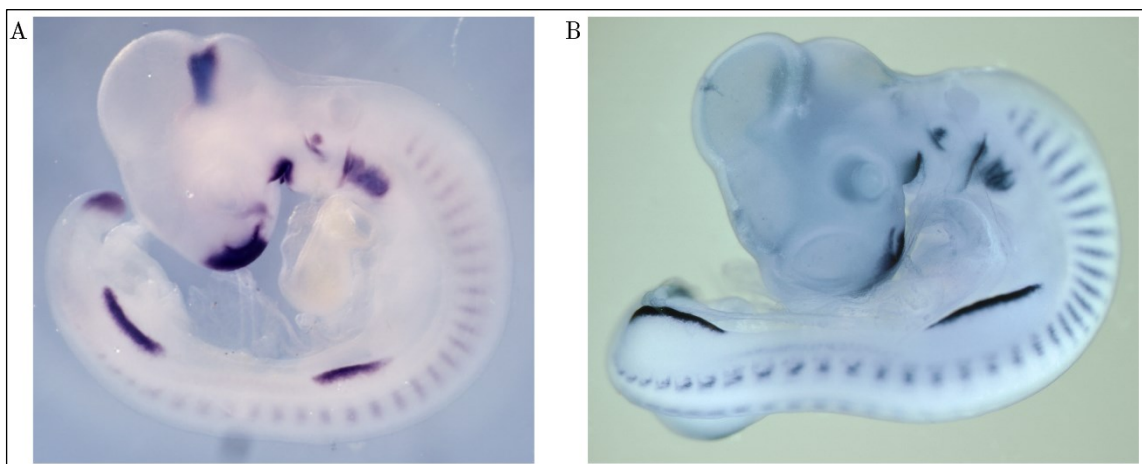
Após a confirmação da especificidade dos *primers*, o produto de RT-qPCR foi utilizado para a produção da sonda por transcrição *in vitro*, conforme descrito no tópico 4.7.1. Após o processo de síntese, foi obtido 6,80ng/μl de sonda de RNA para identificação do ZIKV. Essa quantidade é suficiente para realização da ISH (Creuzet *et al.*, 2002; Henrique *et al.*, 1995).

5.7.1 Padronização de técnica de hibridização *in situ*

A técnica de hibridização *in situ* tem a capacidade de marcar ácidos nucleicos de interesse em tecidos, partes ou embrião inteiro. Após a produção da sonda de RNA direcionada ao ZIKV, foi necessária a validação do protocolo da técnica de hibridização *in situ* e verificação da qualidade dos reagentes utilizado pelo grupo no laboratório. Essa etapa se fez necessária pois com a pandemia de Covid-19, as atividades do laboratório foram paradas por dois anos e dessa forma a técnica não pode ser realizada nesse período. Além disso, a hibridização para ZIKV em embriões inteiros nunca havia sido feita antes, sendo assim essa padronização prévia de reagentes e processos, reduziria o número de variáveis no processo. Para o teste da

hibridização *in situ* foi utilizado um embrião fixado em formaldeído a 4% em PBS com idade de E3, que não foi inoculado com ZIKV. Foi realizada hibridização *in situ* com uma sonda de RNA direcionada ao RNA mensageiro do Fgf8 (sonda previamente testada). No processo de hibridização, os reagentes foram validados vistos pelos resultados positivos da técnica de ISH. Foi possível observar marcações altamente específicas para Fgf8, e para confirmar o resultado, a imagem foi comparada com a do banco de dados *Gallus Expression In Situ Hybridization Analysis* (Geisha) (Figura 24). E esse resultado validou a técnica para ser utilizada com a sonda produzida para o ZIKV.

Figura 24 - Embrião em idade de E3 marcado para Fgf8



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: A foto da hibridização *in situ* do gene Fgf8 em embriões com idade de E3 (HH20). A – Foto realizada pelo autor. B – Foto retirada do banco de dados do Geisha para comparação (Geisha, 2023).

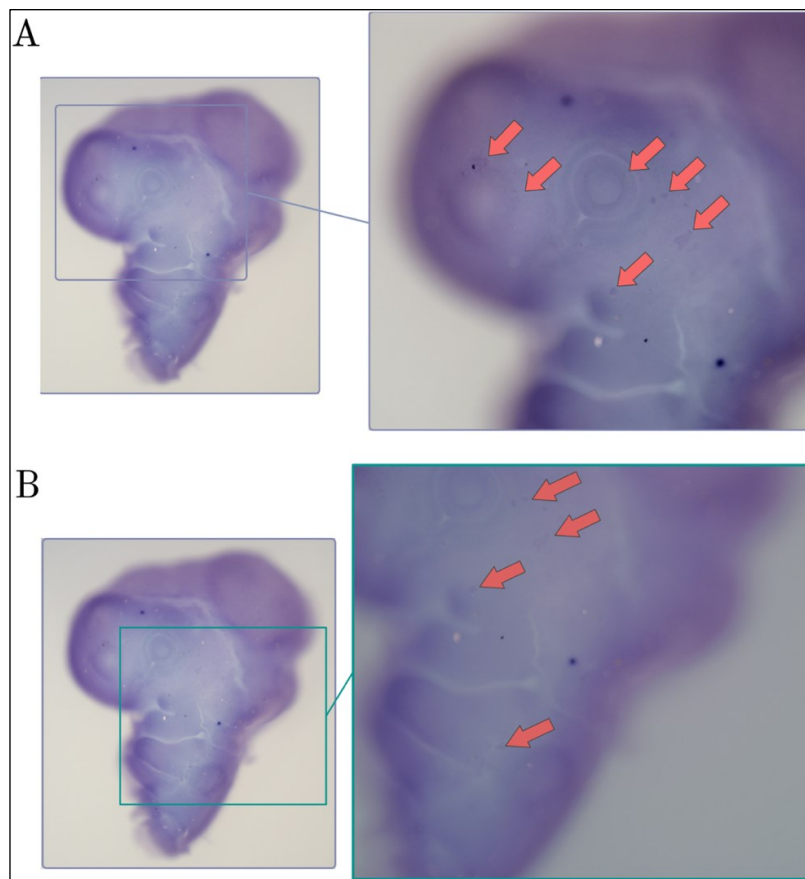
5.7.2 Hibridização *in situ* para ZIKV em embriões de E3

Para chegar ao ponto de realizar a hibridização *in situ* para ZIKV em embriões inteiros, foi necessária não apenas a validação a metodologia e reagentes, mas também o desenvolvimento de um método de diagnóstico para ZIKV que preservasse o embrião. Depois de todos esses procedimentos prévios, a próxima etapa seria a realização de hibridização *in situ* para localização dos sítios de infecção do ZIKV. No entanto, pouco antes do início desses experimentos houveram problemas com o fornecimento de ovos (doados pela fazenda da UFSC). Por esse motivo, não foi possível realizar os testes da sonda nos embriões inteiros como planejado no início

do estudo. Dessa forma, para o teste da sonda de ZIKV foram utilizadas cabeças de embriões com idade de E3. Esses embriões haviam sido inoculados com o ZIKV em trabalhos anteriores do grupo (Souza, 2022; Taufer, 2023). Como esses embriões foram isolados antes da padronização do diagnóstico pelas membranas, os corpos deles foram utilizados para o diagnóstico do ZIKV, sendo que apenas as cabeças foram submetidas à hibridização *in situ*.

O procedimento de hibridização *in situ* para ZIKV nos embriões apresentou resultados positivos. Na Figura 25, é possível observar pequenos grupos de pontos de marcação no entorno do telencéfalo, porção superior da vesícula óptica e no processo maxilar, principalmente. Infelizmente, a reação não pôde ser repetida o número de vezes necessárias para que o *background* pudesse ser reduzido. Ainda que o número amostral utilizado para realizar essas as ISHs tenha sido baixo, os resultados são promissores e mostram que há possibilidade de identificar os sítios de infecção do ZIKV, em embriões em desenvolvimento.

Figura 25 - Sítios de infecção de ZIKV marcados por hibridização *in situ*



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: As setas vermelhas estão marcando os prováveis locais de marcação para ZIKV.

6 DISCUSSÃO

A síndrome congênita associada à infecção pelo ZIKV vai muito além da microcefalia, são frequentes relatos de alterações visuais, auditivas e neuropsicomotoras (Brasil, 2023). A gravidade do fenótipo microcefálico, muitas vezes mascara as outras consequências da infecção pelo ZIKV (Werner *et al.*, 2016). Nesse trabalho foi adaptado um método de infecção com ZIKV *in ovo* não letal que permite análises em diversas idades.

A sobrevivência de embriões positivos para ZIKV é fundamental para que os efeitos do vírus no desenvolvimento possam ser estudados. O protocolo utilizado por Thawani *et al.* (2018), infecta os embriões com alta quantidade de partículas virais, diretamente no ventrículo do mesencéfalo embrionário. Esse é um método que por si só causa lesão do neuroepitélio, ainda leva a grande mortalidade dos embriões infectados. Nos estudos de Wachholz *et al.* (2021), a metodologia foi menos invasiva, o vírus é colocado sobre as membranas extraembrionária, porém também com altas cargas virais, mas com baixa mortalidade. A metodologia utilizada em nossos estudos é semelhante à metodologia utilizada por Goodfellow *et al.* (2016), em que o ZIKV é inoculado através de uma pequena abertura da membrana amniótica, diretamente sobre a região do coração primitivo. Porém o modelo de infecção utilizado por Goodfellow *et al.* (2016) inocula uma quantidade de até 20.000 PFU de ZIKV sendo até 66 vezes maior que a utilizada em nosso modelo nos embriões. Quando comparado o índice de sobrevivência dos embriões de Goodfellow *et al.* (2016), que foram inoculados com uma alta carga viral tiveram baixa taxa de sobrevivência. Nos embriões que foram inoculados com 200 PFU, cerca de 25% sobreviveram até 3 dias pós infecção. Em nossos estudos embriões que foram infectados com 300 PFU de ZIKV, apresentaram taxa de sobrevivência de 69% a 72% um dia após a infecção. Os resultados de estudos anteriores do grupo, mostraram uma taxa de sobrevivência de cerca de 80%, o que está de acordo com os resultados de sobrevivência apresentados nesse estudo (Apêndice A). É importante ressaltar que o grupo apresenta resultados em embriões infectados em E2 e retirados em E3 ou E4 dependendo da análise ((Benevenuti, 2022; Souza, 2022; Taufer, 2023).

Um dos parâmetros mais importantes para estudar os efeitos do ZIKV no desenvolvimento, é conhecer a carga viral de cada um dos embriões. Trabalhos anteriores do nosso grupo demonstraram que independente do protocolo de infecção

utilizado, a carga viral dos embriões é extremamente variável (na ordem de 1000x) entre indivíduos (Benevenuti, 2022; Souza, 2022; Taufer, 2023). Curiosamente, a grande maioria dos trabalhos que relacionam ZIKV com malformações não faz esse diagnóstico individualizado de forma cuidadosa. Nesse trabalho foram tomadas uma série de medidas que permitissem a quantificação do ZIKV em cada um dos embriões. O RNA foi quantificado por fluorimetria (método ouro de quantificação de RNA) e sua integridade analisada por RT-qPCR de um gene de referência (*Mrps27*) e um gene, cujo o desenho do *primer*, permitisse identificar possíveis contaminações com DNAG (*Dlx5*). Nos estudos de Nascimento *et al.* (2015), os autores demonstraram que o gene *Mrps27* em *G. gallus* é um ótimo gene de referência por não apresentar grande variação de sua expressão em diversas situações, como infecção por patógenos, por exemplo. Em nossas pesquisas, não houve diferença estatisticamente significativa na expressão do gene de referência ao compararmos os embriões controle com aqueles infectados pelo ZIKV. (Apêndice C). Na literatura também é demonstrado que a *melt curve* pode ser utilizada para distinguir produtos desejados ou indesejados de uma amostra sendo dimerização de *primers* ou sequências de DNA que não são alvo das análises realizadas (Ririe; Rasmussen; Wittwer, 1997). Segundo nossos resultados não houve presença de pico duplo para os RNAs que foram testados pelo gene *Dlx5*, mostrando que a amostra estava livre de DNAG. Uma vez verificada a qualidade dos RNAs extraídos de embriões inoculados com ZIKV, o próximo desafio foram os métodos para diagnóstico do ZIKV utilizados. As principais barreiras que deveriam ser vencidas nessa etapa eram: o alto custo dos insumos e os embriões que seriam utilizados em análises de imagens deveria ter um diagnóstico indireto. Importante lembrar que para a reação de RT-qPCR o embrião é desintegrado para a extração do RNA.

É importante deixar claro que essa etapa do projeto foi desenvolvida no ano de 2021, período final da pandemia de Covid-19. A alta demanda por insumos de RT-qPCR para o diagnóstico de Covid-19, fez os preços se elevarem muito. Para contornar esse problema, foram realizadas tentativas para padronizar a técnica de RT-LAMP com o intuito de diagnosticar o ZIKV nos embriões. A técnica de RT-LAMP já é amplamente utilizada, como *point-of-care* para diagnósticos de diversas doenças como Dengue e Covid-19 por exemplo (Das; Lin; Chuang, 2022; Mautner *et al.*, 2020; Moehling *et al.*, 2021). Observando as qualidades da técnica de RT-LAMP e com o propósito de diminuir os custos para diagnóstico dos embriões com ZIKV, a proposta

foi padronizar a técnica de RT-LAMP para diagnóstico de ZIKV em embriões de *G. gallus*. O principal atrativo da técnica de RT-LAMP é seu custo menor. Para realizar o diagnóstico RT-LAMP com o kit utilizado o preço ficava em torno de R\$ 2,60 por reação, porém quando era utilizada a técnica de RT-qPCR o preço ficava em torno de R\$ 7,94 por reação no ano de 2021. Após o levantamento de preço acima foi escolhido padronizar a técnica de RT-LAMP. A utilização da técnica de RT-LAMP para diagnóstico de ZIKV já foi descrita por diversos trabalhos realizados nos últimos anos (Aonuma *et al.*, 2022; Calvert *et al.*, 2017; Teoh *et al.*, 2020).

No entanto, os resultados do diagnóstico para ZIKV utilizando a técnica de RT-LAMP, nesse trabalho, não apresentaram resultados satisfatório. A enzima polimerase Bst 3.0, segundo o fabricante, apresentaria atividade de transcrição reversa, o que também foi observado por Wang *et al.* (2017) e Silva *et al.* (2021). Estudos realizados por Park *et al.* (2020), também tiveram resultados positivos quando utilizaram a enzima polimerase Bst 3.0, porém seus testes foram utilizando uma RT logo no início do processo, não sendo necessária a atividade de transcrição reversa da Bst 3.0. Em nossos estudos, os resultados foram diferentes dos obtidos nos estudos citados acima, pois em nossos experimentos os resultados de RT da enzima Bst 3.0 utilizada foram insuficientes. Apenas quando foi adicionado uma RT exógena ao kit foi observada amplificação. Alguma falha na fabricação do lote utilizado, poderia explicar os resultados inesperados. Se fosse necessário RT suplementar, a técnica poderia ser utilizada, isso elevaria o custo, tornando-a inviável para nossos estudos. Para concluir os diagnósticos do ZIKV nas amostras foi realizada então a técnica de RT-qPCR. A utilização da RT-qPCR para o diagnóstico do ZIKV permitiu, além do diagnóstico qualitativo, a quantificação da carga viral de cada amostra de forma individualizada (Gregorova; Heinonen; Sarin, 2022; Nolan; Hands; Bustin, 2006).

Nesse trabalho foram obtidos embriões positivos para ZIKV com índices variando em torno de 33% a 78%, dependendo da idade em que a análise foi realizada. Embriões infectados com 3 dias de desenvolvimento (E3) e analisados 24h depois (E4) apresentaram a menor taxa de embriões positivos para ZIKV. A possibilidade é que nessa idade os embriões possam ser menos susceptíveis à infecção pelo ZIKV, pois a neurogênese é iniciada apenas entre as idades de E4 e E5, sendo o ZIKV um vírus com alto tropismo por progenitores neurais, essa poderia ser uma das explicações (Bhagat, *et al.*, 2021; Rengifo, *et al.*, 2023; Tsai; Garber; Larramendi, 1981). Na idade de E5 a taxa de infecção foi de 78.78%, a maior taxa de

infecção observada no estudo. O dado mais impressionante, no entanto, é a diferença na carga viral dos embriões infectados em diferentes idades. Embriões em idade de E5 apresentaram aproximadamente 19.3 vezes maior carga viral quando comparados com E4. Os achados de Wachholz *et al.* (2021), mostraram que, mesmo com método de infecção diferente, o pico da carga viral foi em embriões de *G. gallus* com idade de E5,5. Esses dados sugerem fortemente que a idade que permeia o quinto dia embrionário apresenta maior predisposição para infecção pelo ZIKV. Essas taxas de replicação podem estar associadas a neurogênese dos embriões de *G. gallus* que inicia logo nos entre o 3º e 4º dias de incubação dos embriões (Charvet; Sandoval; Striedter, 2010; King; Irigoyen, 2021). Trabalho anteriores já demonstraram que o ZIKV tem tropismo por progenitores neurais o que poderia explicar a alta taxa de replicação e as diferenças entre os dias de infecção (Garcez, *et al.*, 2016; Qian *et al.*, 2016). Outra explicação pelo motivo desse resultado, seria que o ZIKV também tem alto tropismo por algumas células imunológicas, como os macrófagos, que em idades de E4 e E5 invadem o SNC e isso também poderia explicar essa alta taxa de replicação viral, porém para confirmar mais teste seriam necessários (Fujimura *et al.*, 2023; Perry; Teeling, 2013; Prinz *et al.*, 2021; Schmitt *et al.*, 2023).

Para obter uma compreensão mais completa das dinâmicas de infecção, é crucial não apenas avaliar a quantidade de vírus presente no embrião, mas também identificar com precisão a localização exata dos pontos de infecção. Com isso é possível identificar as prováveis perturbações moleculares que o ZIKV pode estar causando nos locais de infecção. Para isso é necessário localizar os sítios de infecção diretamente nos embriões. Todavia, normalmente para o diagnóstico do ZIKV, o tecido do embrião é desintegrado (para a extração do RNA). Portanto, o primeiro passo é padronizar metodologias de diagnóstico que possibilitem a preservação dos tecidos embrionários. Existem alguns métodos diagnósticos para o ZIKV, como RT-qPCR ou RT-LAMP que utilizam a detecção de componentes virais, como o RNA. Existem também os ensaios sorológicos que medem a concentração de anticorpos contra proteínas virais (resposta imune do hospedeiro), para o diagnóstico do ZIKV (Herrada *et al.*, 2018; Musso; Gubler, 2016). Em embriões muito novos, como os utilizados nesse estudo, o método mais sensível é o RT-qPCR. Então iniciamos a busca para uma forma de diagnóstico que não fosse necessário utilizar o embrião diretamente, mas ainda fosse confiável para o diagnóstico do ZIKV. A primeira estratégia foi a utilização do sangue ou outros fluidos dos embriões, como nos exames tradicionais

(Gorchakov *et al.*, 2019). Porém, a remoção de fluidos desses embriões não foi viável pelo tamanho reduzido dos embriões, pois os embriões em E4 tem cerca de 4mm de comprimento, e embriões em E5 têm aproximadamente 5mm de comprimento (Singh *et al.*, 2017), O uso do sangue foi cogitado, porém em embriões pré-eclosão ou recém-nascidos é possível coletar em torno de 100 a 150µl de sangue o que já seria pouco para os testes diagnósticos, e em embriões de E4 e E5 então a técnica fica inviável (Watson, 2012). A segunda estratégia, envolve a utilização das membranas extraembrionárias (tópico 4.8), como um indicador indireto da carga viral, o que nunca tinha sido feito antes na literatura. Os resultados de diagnósticos para ZIKV nas membranas extraembrionárias foram positivos. Durante os testes de diagnóstico, 100% das membranas demonstraram resultados positivos para a infecção pelo ZIKV. Nesta fase de padronização, quando examinamos a carga viral dos embriões e suas membranas extraembrionárias correspondentes, observamos uma correlação significativamente alta entre eles. Esse é o primeiro trabalho do gênero que propõe esse tipo de análise indireta para diagnóstico do ZIKV, mostrando o vírus apresenta tropismo pelas células presentes nas membranas (Callegari-Jacques, 2003 p.90; Yan, Zhihong *et al.*, 2019).

Sendo confirmada uma forma de diagnóstico para ZIKV sem a utilização do embrião ou partes dele, o próximo passo foi a localização dos sítios de infecção do ZIKV no embrião de *G. gallus*. A técnica de hibridização *in situ* foi a maneira escolhida por permitir marcar com alta sensibilidade o RNA viral. A utilização de hibridização *in situ* para marcar o vírus da Zika foi realizado por diversos pesquisadores como Ball *et al.* (2022), que utilizou em lâminas histológicas para marcar o trato reprodutivo de macacos, ou Newman *et al.* (2021), que realizou a marcação de cortes histológicos de placenta de fêmeas de Macacos Rhesus, após realizar inoculação do ZIKV intravaginal. A técnica também foi realizada em humanos, nos estudos de Langerak *et al.* (2022), também trabalhando com placenta. O grande problema é que todos esses trabalhos citados foram realizados em cortes histológicos, utilizando sondas de radioisótopos para realizar a marcação. Esse tipo de análise é inviável para ser realizada em larga escala analisando embriões inteiros. A grande diversidade de malformações apresentadas por crianças infectadas com ZIKV, sugere um grande número de sítios de infecção. Uma identificação precisa desses sítios, só pode ser realizada com análises de embriões inteiros, em partes ou órgãos. Em nosso estudo foi proposto marcar grandes regiões ou embriões inteiros no início do

desenvolvimento. Para que isso fosse possível, foi desenvolvida uma sonda de RNA marcado com dig específica para ZIKV. Apesar desse tipo de sonda oferecer uma marcação não isotópica, um pouco menos sensível em comparação as sondas radioativas (Komminoth, 1992), a sensibilidade é satisfatória para nossos objetivos.

O desenho da sonda para hibridização *in situ* do ZIKV nos embriões estudados, foi realizado numa região do genoma do ZIKV já utilizada previamente para desenho de *primers* e sonda para RT-qPCR. Os autores que fizeram esses *primers* e sonda, utilizaram uma região do genoma que é transcrita a glicoproteína do envelope, pois a região apresenta alta homologia entre as cepas de ZIKV e diverge de outros flavivírus. A sonda para RT-q PCR apresentou segundo os autores uma especificidade de 25 cópias virais o que é altamente específica. Além disso, não apresentou reatividade para o DENV-1, 2 3 e 4, vírus da Febre Amarela entre outros flavivírus (Lanciotti *et al.*, 2008). Como essa região do genoma do ZIKV mostrou ter alta especificidade, a nossa sonda de RNA marcado com Dig para a hibridização *in situ* foi feita a partir da mesma região. Nos ensaios realizados com a nossa sonda para a hibridização *in situ*, as marcações foram positivas para o ZIKV, porém com um grande *background*. Essa situação pode surgir em várias circunstâncias, já que a sonda de RNA marcada com Dig pode, por si só, criar esse ruído de fundo. Contudo, existem várias estratégias que podem ser empregadas para lidar com isso, como aumentar a temperatura de hibridização e a intensidade das lavagens. Além disso, é possível utilizar levamisole com o propósito de reduzir o nível de *background*. (Baldino; Chesselet; Lewis, 1989; Komminoth, 1992). Outra possibilidade que explicaria um alto *background*, seria sonda estar anelando parcialmente de forma inespecífica (Binder; Preibisch, 2005). Porém quando avaliado a possibilidade de anelamento inespecífico, tanto de *primers*, quanto de regiões ao longo da sonda, nenhum dos testes *in silico* realizados mostraram essa possibilidade.

Apesar do alto *background* é possível identificar sítios de infecção pelo ZIKV nos embriões (Figura 25). Essas marcações observadas corroboram parcialmente com o que está descrito na literatura sobre sítios de infecção do ZIKV. O ZIKV demonstra afinidade por receptores encontrados em células SNC em desenvolvimento, bem como em vários outros locais do corpo, como evidenciado pelos resultados, inclusive em membranas extraembrionárias. (Kim *et al.*, 2020; Ribeiro *et al.*, 2017; Wu *et al.*, 2018). Segundo Schultz *et al.* (2021), em seus estudos mostram que a infecção do ZIKV pode estar associada ao nervo óptico, cérebro e

medula espinal, com maior incidência na substância branca. Além do SNC, nossos dados mostram sítios de infecção associados ao olho em desenvolvimento (Labib; Chigbu, 2022).

As células da crista neural cefálica secretam moléculas sinalizadoras capazes de influenciar fortemente no volume do telencéfalo (Creuzet; Couly; Le Douarin, 2005). Já foi demonstrado que o ZIKV é capaz de infectar as células da crista neural cefálica, perturbando a dinâmica da migração e/ou proliferação dessas células (Bayless *et al.*, 2016; Cumberworth *et al.*, 2017; Miner; Michael *et al.*, 2017). Em nossos resultados observamos marcações para ZIKV no mesênquima da cabeça, em regiões fortemente sugestivas para serem células da crista neural cefálica. Na Figura 25 é possível notar marcação em toda região da face, além de também visualizamos marcação no broto maxilar do primeiro arco branquial, corroborando com os estudos que mostram o ZIKV pode estar associado a infecção de células da crista neural cefálica e/ou seus derivados.

Os resultados das marcações do ZIKV ainda são muito preliminares, sendo necessária a revisão da técnica, e o teste de outras sondas com locais diferentes do genoma viral. Atualmente, no âmbito do grupo, estão em curso estudos que visam desenvolver sondas direcionadas aos RNAs das proteínas NS5, NS1, NS4B e à glicoproteína do envelope do genoma do vírus Zika (ZIKV). Essas sondas são de diferentes tamanhos, buscando diminuir o *background*, pois podem se ligar a sítios mais restritos do genoma viral, ou caso liguem a sítios inespecíficos possam ser mais fáceis de remover durante as lavagens realizadas durante os procedimentos descritos no tópico 4.7.2. Essas novas sondas foram desenvolvidas buscando inibir ligações inespecíficas não detectáveis *in silico*.

Os resultados apresentados neste estudo, embora necessitem de uma investigação mais aprofundada, mostram-se altamente promissores e podem servir como base para a identificação de novos locais e células suscetíveis à infecção pelo vírus Zika (ZIKV) em embriões em estágios iniciais de desenvolvimento. Um mapeamento abrangente dos sítios de infecção do ZIKV tem o potencial de contribuir significativamente para a descoberta de novos mecanismos moleculares, permitindo a identificação de novos alvos celulares e receptores relacionados à infecção. Tais informações são de extrema relevância para a saúde pública em geral, pois não apenas aprofundam nossa compreensão da dinâmica da infecção pelo ZIKV, mas

também podem orientar o desenvolvimento de políticas de proteção mais eficazes para grupos de alto risco, como mulheres grávidas em áreas endêmicas da doença.

7 CONCLUSÃO

- Este estudo possibilitou o desenvolvimento e a padronização de técnicas que levaram à identificação de uma maior susceptibilidade à infecção pelo vírus Zika (ZIKV) durante o desenvolvimento de embriões de *G. gallus*, ao mesmo tempo em que permitiu o mapeamento dos locais de infecção do ZIKV em várias regiões da cabeça desses embriões.
- A padronização do método de infecção do ZIKV em embriões de *G. gallus*, com a administração do vírus na região cardíaca, resultou em resultados promissores. Estes incluem uma baixa taxa de mortalidade em comparação com os embriões de controle, uma taxa de infecção satisfatória em comparação com estudos anteriores e êxito nas análises posteriores após a aplicação deste método de infecção.
- Os resultados deste estudo indicam que os embriões infectados no quarto dia de desenvolvimento (E4) apresentam, 24 horas após a infecção, uma elevada taxa de infecção e uma notável replicação do ZIKV. Isso demonstra que essa fase inicial do desenvolvimento, especificamente nesse estágio, é altamente suscetível à infecção pelo ZIKV.
- A técnica desenvolvida neste estudo para a identificação dos sítios de infecção do ZIKV demonstrou resultados promissores. Foi possível marcar com sucesso os locais de infecção do ZIKV na cabeça dos embriões no estágio E3, incluindo áreas previamente conhecidas como alvos da infecção pelo vírus Zika. Embora os resultados ainda sejam preliminares, eles são encorajadores em relação ao alcance do nosso objetivo proposto.

8 PERSPECTIVAS

O desenvolvimento de diferentes sondas com locais variados do genoma do ZIKV pode ser uma saída para melhorar e refinar as marcações do ZIKV nos embriões testados. Além dos testes em diferentes idades em embriões inteiros no início da fase embrionária são interessantes para acompanhar os diferentes sítios de infecção, e entender quais as células que o vírus apresenta maior susceptibilidade.

A partir dos dados sobre os locais de infecção, como aqueles que foram observados no telencéfalo nos nossos resultados, torna-se factível identificar e investigar os genes responsáveis pelo desenvolvimento dessas áreas específicas. Isso abre a possibilidade de conduzir marcações de hibridização *in situ* para esses genes, a fim de entender de que forma o ZIKV pode estar afetando a expressão deles. Estudos nessa direção estão atualmente em andamento no grupo, visando identificar os genes associados a algumas das regiões que demonstraram marcação positiva para o ZIKV.

Ainda com as marcações, é possível investigar locais em que o ZIKV e não tenha sido descrito. A busca para entender quais receptores o vírus utiliza para entrar na célula, buscando compreender novos mecanismos de infecção, além de procurar entender alguns dos sintomas da SCZ que ainda não tenha explicações concretas.

Ainda que esse estudo se concentrou apenas no início do desenvolvimento de embriões de *G. gallus*, foram abertas diversas possibilidades de descoberta para novos sítios de infecção pelo ZIKV. Esses resultados podem nortear novos estudos a buscarem tecidos e/ou órgão de embriões com idades mais avançadas do desenvolvimento. Além de que é possível alongar o tempo de incubação do ZIKV, nos embriões. Mesmo que nos embriões mais velhos não seja possível marcar o vírus no corpo todo com a técnica que padronizamos, há possibilidade realizar a marcação em tecidos ou células específicas.

Essas são algumas das diversas possibilidades em que são possíveis realizar a partir desse estudo. Porém há muito trabalho ainda para obter respostas concretas de quais motivos levam o ZIKV a ser um agente teratogênico. Porém com trabalhos como estes, abre novas possibilidades para ficar mais perto de compreender como esse mecanismo que pode trazer diversos problemas a sociedade funciona.

REFERÊNCIAS

- ABTIBOL-BERNARDINO, Marília Rosa *et al.* Neurological Findings in Children without Congenital Microcephaly Exposed to Zika Virus in Utero: A Case Series Study. **Viruses**, Basel, v. 12, n. 11, 2020. DOI: 10.3390/V12111335. Disponível em: /pmc/articles/PMC7699969/. Acesso em: 14 jun. 2023.
- ALBUQUERQUE, Maria de Fatima Pessoa Militão *et al.* Epidemia de Microcefalia e Vírus Zika: A Construção do Conhecimento em Epidemiologia. **Cadernos de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 34, n. 10, p. e00069018, 2018. DOI: 10.1590/0102-311X00069018. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/csp/a/qxpH3vtWSnHV5WfCBGGGfyd/?lang=pt>. Acesso em: 13 jun. 2023.
- ANTONIOU, Evangelia *et al.* Zika Virus and the Risk of Developing Microcephaly in Infants: A Systematic Review. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, Basel, v. 17, n. 11, 2020. DOI: 10.3390/IJERPH17113806. Disponível em: /pmc/articles/PMC7312578/. Acesso em: 13 jun. 2023.
- AONUMA, Hiroka *et al.* LAMP Detection of Virus-Derived DNA of Zika Virus in Vector Mosquito. **Frontiers in Tropical Diseases**, Lausanne, v. 3, p. 759375, 2022. DOI: 10.3389/FITD.2022.759375. Acesso em: 19 jun. 2023.
- BALDINO, Frank J.; CHESSELET, Marie Françoise; LEWIS, Michael E. High-resolution in Situ Hybridization Histochemistry. **Methods in Enzymology**, [S.l.] v. 168, n. 1, p.761-77. 1989. Doi: 10.1016/0076-6879(89)68057-3.
- BALL, Erin E. *et al.* Zika Virus Persistence in the Male Macaque Reproductive Tract. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 16, n. 7, 2022. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0010566. Disponível em: /pmc/articles/PMC9299295/. Acesso em: 8 jun. 2023.
- BARBI, Ludovica *et al.* Prevalence of Guillain-Barré Syndrome Among Zika Virus Infected Cases: A Systematic Review and Meta-analysis. **The Brazilian Journal of Infectious Diseases**, Salvador, v. 22, n. 2, p. 137–141, 2018. DOI: 10.1016/J.BJID.2018.02.005.
- BAYLESS, Nicholas *et al.* Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 20, n. 4, p. 423, 2016. DOI: 10.1016/J.CHOM.2016.09.006. Disponível em: /pmc/articles/PMC5113290/. Acesso em: 9 jun. 2023.
- BENAVIDES-LARA, Adriana *et al.* Zika Virus–Associated Birth Defects, Costa Rica, 2016–2018. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 27, n. 2, p. 360, 2021. DOI: 10.3201/EID2702.202047. Disponível em: /pmc/articles/PMC7853552/.
- BENEVENUTTI, Felipe Zanghelini. **Influência do Vírus da Zika no Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e dos Ossos Cranianos em Embriões de Gallus gallus domesticus**. 2022. Trabalho de Conclusão de Curso (Licenciatura em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

Bhagat, Reshma *et al.* Molecular Mechanisms of Zika Virus Pathogenesis: An Update. **The Indian journal of medical research** [S.l.], v.154, n.3, p. 433-445, 2021. DOI:10.4103/ijmr.IJMR_169_20. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9131805/>. Acesso em: 23 set. 2023.

BINDER, Hans; PREIBISCH, Stephan. Specific and Nonspecific Hybridization of Oligonucleotide Probes on Microarrays. **Biophysical Journal**, Rockville, v. 89, n. 1, p. 337, 2005. DOI: 10.1529/BIOPHYSJ.104.055343. Disponível em: </pmc/articles/PMC1366534/>. Acesso em: 27 jul. 2023.

BJØRNSTAD, Sigrid; *et al.* Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. **Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, Rockville, v. 355, n. 3, p. 386–396, 2015. DOI: 10.1124/JPET.115.227025. Disponível em: <https://jpet.aspetjournals.org/content/355/3/386>. Acesso em: 14 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Vírus Zika no Brasil - A resposta do SUS**. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2017. Disponível em: https://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf. Acesso em: 15 jun. 2023.

BRASIL. Ministério da Saúde. **Zika Vírus**. Brasília: Ministério da Saúde. 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus>. Acesso em: 22 jun. 2023.

BRONNER, Marianne E.; LEDOUARIN, Nicole M. Development and Evolution of the Neural Crest: An Overview. **Developmental Biology**, Dallas, v. 366, n. 1, p. 2–9, 2010. DOI: 10.1016/j.ydbio.2011.12.042.

BURKE, Rachael *et al.* Zika Virus Infection During Pregnancy: What, Where, and Why? **The British Journal of General Practice**, London, v. 66, n. 644, p. 122, 2016. DOI: 10.3399/BJGP16X683917. Disponível em: </pmc/articles/PMC4758474/>. Acesso em: 15 jun. 2023.

BURRELL, Chirstopher; HOWARD, Collin; MURPHY, Frederick. Laboratory Diagnosis of Virus Diseases. **Fenner and White's Medical Virology**. [S.l.], v. 1, p.135 – 154, 2017. DOI: 10.1016/B978-0-12-375156-0.00010-2. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7149825/>. Acesso em: 19 set. 2023.

CALLEGARI-JACQUES, Sidia. **Bioestatística: Princípios e Aplicações**. 1. ed. Porto Alegre: Grupo A - Artmed, 2003.

CALVERT, Amanda *et al.* Rapid Colorimetric Detection of Zika Virus from Serum and Urine Specimens by Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). **PLOS ONE**, San Francisco, v. 12, n. 9, 2017. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0185340. Disponível em: <https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0185340>. Acesso em: 19 jun. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Facts about Craniosynostosis**. 2023. Disponível em: <https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/craniosynostosis.html>. Acesso em: 24 jul. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Fatos Sobre a Microcefalia**. 2022. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/ncbddd/birthdefects/portuguese/microcephaly.html#:~:text=A%20microcefalia%20%C3%A9%20uma%20malforma%C3%A7%C3%A3o,n%C3%A3o%20ter%20se%20desenvolvido%20adequadamente>. Acesso em: 14 jun. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Microcephaly & Other Birth Defects**. 2019. Disponível em:

https://www.cdc.gov/zika/healtheffects/birth_defects.html. Acesso em: 13 jun. 2023.

CDC. Centers for Disease Control and Prevention. **Zika Virus**. 2022. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/zika/>. Acesso em: 14 jun. 2023.

CHARVET, Christine J.; SANDOVAL, Alexis L.; STRIEDTER, Georg F. Phylogenetic Origins of Early Alterations in Brain Region Proportions. **Brain, Behavior and Evolution**, Basel, v. 75, n. 2, p. 104, 2010. DOI: 10.1159/000300573. Disponível em: </pmc/articles/PMC2914409/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

CONTRERAS, Deisy; ARUMUGASWAMI, Vaithilingaraja. Zika Virus Infectious Cell Culture System and the In Vitro Prophylactic Effect of Interferons. **Journal of Visualized Experiments: JoVE**, Cambridge, v. 2016, n. 114, p. 54767, 2016. DOI: 10.3791/54767. Disponível em: </pmc/articles/PMC5091946/>. Acesso em: 14 jun. 2023.

CORONELL-RODRÍGUEZ, Wilfrido *et al.* Zika Virus Infection in Pregnancy, Fetal and Neonatal Impact. **Revista chilena de infectología**, Santiago, v. 33, n. 6, p. 665–673, 2016. DOI: 10.4067/S0716-10182016000600009. Disponível em: http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0716-10182016000600009&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 24 jul. 2023.

COUNOTTE, Michel Jacques *et al.* Sexual Transmission of Zika virus and other flaviviruses: A living systematic review. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 15, n. 7, p. 3, 2018. DOI: 10.1371/JOURNAL.PMED.1002611.

CREUZET, Sophie E. Regulation of Pre-otic Brain Development by the Cephalic Neural Crest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, Washington, v. 106, n. 37, p. 15774–15779, 2009. DOI: 10.1073/PNAS.0906072106.

CREUZET, Sophie *et al.* Negative Effect of Hox Gene Expression on the Development of the Neural Crest-derived Facial Skeleton. **Development**, Cambridge, v. 129, n. 18, p. 4301–4313, 2002. DOI: 10.1242/DEV.129.18.4301. Disponível em: <https://journals.biologists.com/dev/article/129/18/4301/17880/Negative-effect-of-Hox-gene-expression-on-the>. Acesso em: 30 maio. 2023.

CREUZET, Sophie; COULY, Gérard; LE DOUARIN, Nicole M. Patterning the Neural Crest Derivatives During Development of the Vertebrate Head: Insights from Avian Studies. **Journal of Anatomy**, London, v. 207, n. 5, p. 447, 2005. DOI: 10.1111/J.1469-7580.2005.00485.X. Disponível em: </pmc/articles/PMC1571568/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

CUMBERWORTH, Stephanie L. *et al.* Zika Virus Tropism and Interactions in Myelinating Neural Cell Cultures: CNS Cells and Myelin are Preferentially Affected." **Acta Neuropathologica Communications**, [S.l.], v. 5 n.1 p.50, 2017. DOI:10.1186/s40478-017-0450-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5481922/>. Acesso em: 22 set. 2023.

DAS, Dhruvajyoti; LIN, Cheng Wen; CHUANG, Han Sheng. LAMP-Based Point-of-Care Biosensors for Rapid Pathogen Detection. **Biosensors**, Basel, v. 12, n. 12, p. 1068, 2022. DOI: 10.3390/BIOS12121068. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2079-6374/12/12/1068/htm>. Acesso em: 30 maio. 2023.

DHAMA, Kuldeep *et al.* Zika Virus / Zika Fever: A Comprehensive Update. **Journal of Experimental Biology and Agricultural Sciences**, Rajasthan, v. 6, n. 1, p. 1–31, 2018. DOI: 10.18006/2018.6(1).1.31. Disponível em: http://jebas.org/uploads/138_pdf.pdf.

DICK, G.; KITCHEN, S.; HADDOW, A. Zika virus. Isolations and Serological Specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952. DOI: 10.1016/0035-9203(52)90042-4. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12995440/>. Acesso em: 27 jan. 2022.

FREITAS, Danielle *et al.* Congenital Zika Syndrome: A Systematic Review. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 12, 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0242367. Disponível em: </pmc/articles/PMC7737899/>. Acesso em: 19 maio. 2023.

FUJIMURA, Kimino *et al.* Integrative Systems Biology Characterizes Immune-Mediated Neurodevelopmental Changes in Murine Zika Virus Microcephaly. **iScience**, [S.l.], v. 26, n.7, p.106909, 2023. DOI:10.1016/j.isci.2023.106909. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10275723/>. Acesso em: 23 set. 2023.

GARCEZ, Patricia P. *et al.* Zika virus: Zika Virus Impairs Growth in Human Neurospheres and Brain Organoids. **Science**, Washington, v. 352, n. 6287, p. 816–818, 2016. DOI: 10.1126/SCIENCE.AAF6116/SUPPL_FILE/PAPV2.PDF. Disponível em: <https://www.science.org/doi/10.1126/science.aaf6116>. Acesso em: 9 jun. 2023.

GARCEZ, Ricardo C.; LE DOUARIN, Nicole M.; CREUZET, Sophie E. Combinatorial Activity of Six1-2-4 Genes in Cephalic Neural Crest Cells Controls Craniofacial and Brain Development. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 71, n. 11, p. 2149–2164, 2014. DOI: 10.1007/S00018-013-1477-Z/FIGURES/7.

GEISHA. Gallus Expression in Situ Hybridization Analysis. **FGF8 Chicken Embryo**. [s.d.]. Disponível em: http://geisha.arizona.edu/geisha/photo.jsp?url_path=/geisha/photos/&id=20366. Acesso em: 12 jun. 2023.

GLADWYN-NG, Ivan *et al.* Stress-induced Unfolded Protein Response Contributes to Zika Virus-associated Microcephaly. **Nature Neuroscience**, New York, v. 21, n. 1, p. 63–71, 2017. DOI: 10.1038/s41593-017-0038-4. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/s41593-017-0038-4>. Acesso em: 13 jun. 2023.

GOMES, Julia *et al.* Molecular Mechanisms of ZIKV-Induced Teratogenesis: A Systematic Review of Studies in Animal Models. **Molecular Neurobiology**, Berlin, v. 60, n. 1, p. 68, 2023. DOI: 10.1007/S12035-022-03046-4. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9549063/](#). Acesso em: 9 maio. 2023.

GOODFELLOW, Forrest *et al.* Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. **Stem Cells and Development**, New Rochelle, v. 25, n. 22, p. 1691, 2016. a. DOI: 10.1089/SCD.2016.0231. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6453490/](#). Acesso em: 7 jun. 2023.

GORCHAKOV, Rodion *et al.* Optimizing PCR Detection of Zika Virus from Various Body Fluids. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, Arlington, v. 100, n. 2, p. 427, 2019. DOI: 10.4269/AJTMH.18-0755. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6367632/](#). Acesso em: 10 jun. 2023.

GORMAN, Matthew J. *et al.* An Immunocompetent Mouse Model of Zika Virus Infection. **Cell host & microbe**, Cambridge, v. 23, n. 5, p. 672, 2018. DOI: 10.1016/J.CHOM.2018.04.003. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5953559/](#). Acesso em: 14 jun. 2023.

GREGOROVA, Pavlina; HEINONEN, Minna Maria; SARIN, Peter. An Improved RT-qPCR Method for Direct Quantification of Enveloped RNA Viruses. **MethodsX**, Amsterdam, v. 9, p. 101737, 2022. DOI: 10.1016/J.MEX.2022.101737. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9162933/](#). Acesso em: 10 jun. 2023.

GUBLER, Duane J.; VASILAKIS, Nikos; MUSSO, Didier. History and Emergence of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 216, n. Suppl 10, p. S860, 2017. DOI: 10.1093/INFDIS/JIX451. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5853376/](#). Acesso em: 13 jun. 2023.

HAMBURGER, Viktor; HAMILTON, Howard L. A Series of Normal Stages in the Development of the Chick Embryo. **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 1988, n. 1, p. 49–92, 1951. DOI: 10.1002/jmor.1050880104. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmor.1050880104>. Acesso em: 7 maio. 2023.

HENRIQUE, Domingos *et al.* Expression of a Delta Homologue in Prospective Neurons in the Chick. **Nature**, New York, v. 375, n. 6534, p. 787–790, 1995. DOI: 10.1038/375787a0. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/375787a0>. Acesso em: 30 maio. 2023.

HERRADA, Carlos *et al.* Advances in Diagnostic Methods for Zika Virus Infection. **Journal of Medical Devices**, New York, v. 12, n. 4, p. 0408021, 2018. DOI: 10.1115/1.4041086. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6298530/](#). Acesso em: 19 jun. 2023.

HERRERA, Bobby Brooke *et al.* Continued Transmission of Zika Virus in Humans in West Africa, 1992-2016. **Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 215, n. 10, p. 1546–1550, 2017. DOI: 10.1093/INFDIS/JIX182. Acesso em: 13 jun. 2023.

Ji, Yu *et al.* Wnt Signaling in Neural Crest Ontogenesis and Oncogenesis. **Cells**, Basel, v. 8, n. 10, p. 1173, 2019. a. DOI: 10.3390/CELLS8101173. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1173/htm>. Acesso em: 13 jun. 2023.

JULANDER, Justin G.; SIDDHARTHAN, Venkatraman. Small-Animal Models of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, Oxford, v. 216, n. suppl_10, p. S919–S927, 2017. DOI: 10.1093/INFDIS/JIX465. Disponível em: <https://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix465>. Acesso em: 14 jun. 2023.

KIM, Jihye *et al.* Zika Virus Infects Pericytes in the Choroid Plexus and Enters the Central Nervous System Through the Blood-cerebrospinal Fluid Barrier. **PLoS pathogens**, San Francisco, v. 16, n. 5, 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PPAT.1008204. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32357162/>. Acesso em: 10 jun. 2023.

KING, Emily Louise; IRIGOYEN, Nerea. Zika Virus and Neuropathogenesis: The Unanswered Question of Which Strain Is More Prone to Causing Microcephaly and Other Neurological Defects. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, Lausanne, v. 15, 2021. DOI: 10.3389/FNCEL.2021.695106. Disponível em: </pmc/articles/PMC8514627/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

KOMMINOTH, Paul. Digoxigenin as an Alternative Probe Labeling for In Situ Hybridization. **Diagnostic Molecular Pathology**, Lausanne, v. 1, n. 2, p. 142–150, 1992. Disponível em: https://journals.lww.com/molecularpathology/Abstract/1992/06000/Digoxigenin_as_a_n_Alternative_Probe_Labeling_for.8.aspx. Acesso em: 8 jun. 2023.

KORDING, Konrad; WOLPERT, Daniel M. Bayesian Integration in Sensorimotor Learning. **Nature**, [S.l.], v.427, n.1, p 244–247, 2004. DOI: <https://doi.org/10.1038/nature02169>

KRAUER, Fabienne *et al.* Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain–Barré Syndrome: Systematic Review. **PLoS Medicine**, San Francisco, v. 14, n. 1, 2017. DOI: 10.1371/JOURNAL.PMED.1002203.

LABIB, Bisant A.; CHIGBU, DeGaulle Pathogenesis and Manifestations of Zika Virus-Associated Ocular Diseases. **Tropical Medicine and Infectious Disease**, [S.l.], v. 7, n. 6, p. 106, 2022. DOI: <https://doi.org/10.3390/tropicalmed7060106>

LANCIOTTI, Robert *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, Atlantan, v. 14, n. 8, p. 1232, 2008. DOI: 10.3201/EID1408.080287. Disponível em: </pmc/articles/PMC2600394/>. Acesso em: 10 maio. 2023.

LANGERAK, Thomas *et al.* Transplacental Zika Virus Transmission in Ex Vivo Perfused Human Placentas. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 16, n. 4, 2022. DOI: 10.1371/JOURNAL.PNTD.0010359. Disponível em: </pmc/articles/PMC9060339/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

LEE, Lim Jack *et al.* Hide and Seek: The Interplay Between Zika Virus and the Host Immune Response. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, 2021. DOI: 10.3389/FIMMU.2021.750365.

LINDEMANN-WITTKKE, Dagmar. **Fallbeispiel Pädiatrie – Hypoplastisches Linksherzsyndrom**. Berlin, p. 349–363, 2021. DOI: 10.1007/978-3-662-62243-8_22. Disponível em: https://link.springer.com/chapter/10.1007/978-3-662-62243-8_22. Acesso em: 24 jul. 2023.

LORRANY, Cássia *et al.* Síndrome de Guillain-Barré: Uma Abordagem Sobre os Sintomas e Principais Formas de Tratamento da Doença. **Saúde & Ciência em Ação**, Goiânia, v. 6, n. 1, p. 1–15, 2020.

MARBÁN-CASTRO, Elena *et al.* Neurodevelopment in Normocephalic Children Exposed to Zika Virus in Utero with No Observable Defects at Birth: A Systematic Review with Meta-Analysis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, [S. l.], v. 19, n. 12, 2022. DOI: 10.3390/IJERPH19127319/S1. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9223424/](https://pmc/articles/PMC9223424/). Acesso em: 17 maio. 2023.

MASSETTI, Thais *et al.* Clinical Characteristics of Children with Congenital Zika Syndrome: A Case Series. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, [S. l.], v. 78, n. 7, p. 403–411, 2020. DOI: 10.1590/0004-282X20200020. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/anp/a/JZm8TDF5RWhM6tx8VMt3hWN/?lang=en>. Acesso em: 14 jun. 2023.

MAUTNER, Lena *et al.* Rapid Point-of-care Detection of SARS-CoV-2 Using Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP). **Virology Journal**, [S. l.], v. 17, n. 1, p. 1–14, 2020. DOI: 10.1186/S12985-020-01435-6/FIGURES/6. Disponível em: <https://virologyj.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12985-020-01435-6>. Acesso em: 30 maio. 2023.

MEHRJARDI, Mohammad Zare *et al.* Neuroimaging Findings of Zika Virus Infection: A Review Article. **Japanese Journal of Radiology**, [S. l.], v. 34, n. 12, p. 765–770, 2016. DOI: 10.1007/S11604-016-0588-5/FIGURES/1. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s11604-016-0588-5>. Acesso em: 24 jul. 2023.

MERFELD, Emily *et al.* Potential Mechanisms of Zika-linked Microcephaly. Wiley Interdisciplinary Reviews. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 6, n. 4, p. 273, 2017. DOI: 10.1002/WDEV.273. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5516183/](https://pmc/articles/PMC5516183/). Acesso em: 13 jun. 2023.

MINER, Jonathan; DIAMOND, Michael S. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. **Cell Host & Microbe**, [S. l.], v. 21, n. 2, p. 134-142, 2017. DOI:10.1016/j.chom.2017.01.004. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5328190>. Acesso em: 22 set. 2023.

MOEHLING, Taylor *et al.* LAMP Diagnostics at the Point-of-Care: Emerging Trends and Perspectives for the Developer Community. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 43–61, 2021. DOI: 10.1080/14737159.2021.1873769. Disponível em: <https://www.tandfonline.com/doi/abs/10.1080/14737159.2021.1873769>. Acesso em: 30 maio. 2023.

- MOORE, Cynthia *et al.* Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA pediatrics**, [S. I.], v. 171, n. 3, p. 288–295, 2017. DOI: 10.1001/JAMAPEDIATRICS.2016.3982.
- MUMTAZ, Noreen *et al.* Zika Virus Infection Perturbs Osteoblast Function. **Scientific Reports**, New York, v. 8, n. 1, p. 1–7, 2018. DOI: 10.1038/s41598-018-35422-3.
- MUSSO, Didier; GUBLER, Duane. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, [S. I.], v. 29, n. 3, p. 487, 2016. DOI: 10.1128/CMR.00072-15. Disponível em: /pmc/articles/PMC4861986/.
- NASCIMENTO, Carlos *et al.* Identification of Suitable Reference Genes for Real Time Quantitative Polymerase Chain Reaction Assays on Pectoralis major Muscle in Chicken (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, San Francisco, v. 10, n. 5, 2015. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0127935. Disponível em: /pmc/articles/PMC4447422/. Acesso em: 7 jun. 2023.
- NETTER, Frank. **Atlas of Human Anatomy**. 7. ed. Philadelphia: Elsevier, 2019.
- NEWMAN, Christina *et al.* Early Embryonic Loss Following Intravaginal Zika Virus Challenge in Rhesus Macaques. *Frontiers in Immunology*, Lausanne, v. 12, p. 1, 2021. DOI: 10.3389/FIMMU.2021.686437/FULL. Disponível em: /pmc/articles/PMC8165274/. Acesso em: 8 jun. 2023.
- NOLAN, Tania; HANDS, Rebecca; BUSTIN, Stephen A. Quantification of mRNA Using Real-time RT-PCR. **Nature Protocols**, New York, v. 1, n. 3, p. 1559–1582, 2006. DOI: 10.1038/nprot.2006.236. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2006.236>. Acesso em: 10 jun. 2023.
- NOTOMI, Tsugunori *et al.* Loop-Mediated Isothermal Amplification of DNA. **Nucleic Acids Research**, [S. I.], v. 28, n. 12, p. e63, 2000. DOI: 10.1093/NAR/28.12.E63. Disponível em: /pmc/articles/PMC102748/. Acesso em: 1 jun. 2023.
- NOWAKOWSKI, Tomasz *et al.* Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. **Cell Stem Cell**, [S. I.], v. 18, n. 5, p. 591–596, 2016. DOI: 10.1016/J.STEM.2016.03.012. Acesso em: 13 jun. 2023.
- O'RAHILLY, Ronan; MÜLLER, Fabiola. Developmental Stages in Human Embryos: Revised and New Measurements. **Cells, Tissues, Organs**, [S. I.], v. 192, n. 2, p. 73–84, 2010. DOI: 10.1159/000289817. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/20185898/>. Acesso em: 14 jun. 2023.
- PARK, Gun Soo *et al.* Development of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification Assays Targeting Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 (SARS-CoV-2). **Journal of Molecular Diagnostics**, [S. I.], v. 22, n. 6, p. 729–735, 2020. DOI: 10.1016/j.jmoldx.2020.03.006. Disponível em: <http://www.jmdjournal.org/article/S1525157820300908/fulltext>. Acesso em: 10 jun. 2023.
- PERRY, V. Hugh; TEELING, Jessica. Microglia and Macrophages of The Central Nervous System: The Contribution of Microglia Priming and Systemic Inflammation to Chronic Neurodegeneration. **Seminars in Immunopathology**, [S. I.], v. 35, n.5, p.

601-612, 2013. DOI:10.1007/s00281-013-0382-8. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3742955/>. Acesso em: 23 set. 2023.

PINTO JUNIOR, Vitor Laerte *et al.* Vírus Zika: Revisão para Clínicos. **Acta Médica Portuguesa**, [S. l.], v. 28, n. 6, p. 760, 2015. DOI: 10.20344/amp.6929.

PRINZ, Marco *et al.* Microglia and Central Nervous System-Associated Macrophages-From Origin to Disease Modulation. **Annual Review Of Immunology**, v.39, n. 1, p. 251-277, 2021. DOI:10.1146/annurev-immunol-093019-110159. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC8085109/>. Acesso em: 23 set. 2023.

PRIYADARSHINI, Subhra. How Zika Virus Causes Microcephaly. **Nature India**, New York, 2018. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nindia.2018.93>. Acesso em: 13 jun. 2023.

QIAN, Xuyu *et al.* Brain Region-specific Organoids using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, [S. l.], v. 165, n. 5, p. 1238, 2016. DOI: 10.1016/J.CELL.2016.04.032. Disponível em: [/pmc/articles/PMC4900885/](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4900885/). Acesso em: 8 jun. 2023.

QIAO, Luxi *et al.* Epidemic Preparedness: Prenatal Zika Virus Screening During the Next Epidemic. **BMJ Global Health**, [S. l.], v. 6, n. 6, 2021. DOI: 10.1136/BMJGH-2021-005332.

Rengifo, Aura Caterine *et al.* Morphological and Molecular Changes in the Cortex and Cerebellum of Immunocompetent Mice Infected with Zika Virus. **Viruses**, [S.l.], v. 15, n. 8, p.1632, 2023. DOI:10.3390/v15081632. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC10458311/>. Acesso em: 23 set. 2023.

RIBEIRO, Bianca Guedes *et al.* Central Nervous System Effects of Intrauterine Zika Virus Infection: A Pictorial Review. **Radio Graphics**, [S. l.], v. 37, n. 6, p. 1840–1850, 2017. DOI: 10.1148/RG.2017170023. Disponível em: <https://pubs.rsna.org/doi/10.1148/rg.2017170023>. Acesso em: 10 jun. 2023.

RIRIE, Kirk M.; RASMUSSEN, Randy P.; WITTEWER, Carl T. Product Differentiation by Analysis of DNA Melting Curves during the Polymerase Chain Reaction. **Analytical Biochemistry**, [S. l.], v. 245, n. 2, p. 154–160, 1997. DOI: 10.1006/ABIO.1996.9916. Acesso em: 7 jun. 2023.

ROSSI, Fiorella *et al.* Characterization of Zika Virus Infection of Human Fetal Cardiac Mesenchymal Stromal Cells. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 15, n. 9, 2020. DOI: 10.1371/JOURNAL.PONE.0239238.

ROTHSTEIN, Megan; BHATTACHARYA, Debadrita; SIMOES-COSTA, Marcos. The Molecular Basis of Neural Crest Axial Identity. **Developmental Biology**, [S. l.], v. 444, p. S170–S180, 2018. DOI: 10.1016/J.YDBIO.2018.07.026. Acesso em: 14 jun. 2023.

SCHMITT, Kimberly *et al.* Zika Virus Induced Microcephaly and Aberrant Hematopoietic Cell Differentiation Modeled In Novel Neonatal Humanized Mice. **Frontiers in immunology**, [S. l.], v. 14.1060959, 2023.

DOI:10.3389/fimmu.2023.1060959. Disponível em:
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9941325/>. Acesso em: 23 set. 2023.

SCHRAM, Patricia Cintra Franco. Zika Virus and Public Health. **Journal of Human Growth and Development**, [S. l.], v. 26, n. 1, p. 7–8, 2016. a. DOI: 10.7322/JHGD.114415. Disponível em:
http://pepsic.bvsalud.org/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0104-12822016000100001&lng=pt&nrm=iso&tlng=en. Acesso em: 13 jun. 2023.

SCHULTZ, Verena *et al.* Oligodendrocytes are Susceptible to Zika Virus Infection in a Mouse Model of Perinatal Exposure: Implications for CNS Complications. **Glia**, [S. l.], v. 69, n. 8, p. 2023, 2021. DOI: 10.1002/GLIA.24010. Disponível em:
</pmc/articles/PMC9216243/>. Acesso em: 9 jun. 2023.

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro *et al.* Development and Validation of a One-step Reverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Patient Samples from Brazil. **Scientific Reports**, New York, v. 11, n. 1, 2021. DOI: 10.1038/S41598-021-83371-1. Disponível em:
</pmc/articles/PMC7893177/>. Acesso em: 10 maio. 2023.

SILVA, Severino Jefferson Ribeiro *et al.* Development and Validation of Reverse Transcription Loop-Mediated Isothermal Amplification (RT-LAMP) for Rapid Detection of ZIKV in Mosquito Samples from Brazil. **Scientific Reports**, New York, v. 9, n. 1, p. 1–12, 2019. DOI: 10.1038/s41598-019-40960-5. Disponível em:
<https://www.nature.com/articles/s41598-019-40960-5>. Acesso em: 10 maio. 2023.

SINGH, Raj *et al.* Advances in Diagnosis, Surveillance, and Monitoring of Zika Virus: An Update. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 8, n. JAN, p. 2677, 2017. DOI: 10.3389/FMICB.2017.02677. Disponível em: </pmc/articles/PMC5780406/>. Acesso em: 8 jun. 2023.

SONG, Jinzhao *et al.* Instrument-Free Point-of-Care Molecular Detection of Zika Virus. **Analytical Chemistry**, Washington, v. 88, n. 14, p. 7289–7294, 2016. DOI: 10.1021/ACS.ANALCHEM.6B01632/ASSET/IMAGES/LARGE/AC-2016-01632V_0004.JPEG. Disponível em:
<https://pubs.acs.org/doi/full/10.1021/acs.analchem.6b01632>. Acesso em: 12 maio. 2023.

SOUZA, Camila Santos. **Análise da Influência do Vírus da Zika Sobre a Sinalização de Ácido Retinóico no Desenvolvimento Craniofacial**. 2022
 Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

STROTTMANN, Daisy Maria *et al.* Genetic and Biological Characterisation of Zika Virus Isolates from Different Brazilian Regions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, n. 7, p. e190150, 2019. DOI: 10.1590/0074-02760190150. Disponível em:
<http://www.scielo.br/j/mioc/a/DGsDsJ9jRsrxsHdP7gx66zz/>. Acesso em: 9 maio. 2023.

SU, Xuan *et al.* Human Brain Organoids as an In Vitro Model System of Viral Infectious Diseases. **Frontiers in Immunology**, Lausanne, v. 12, p. 792316, 2022. DOI: 10.3389/FIMMU.2021.792316/BIBTEX. Acesso em: 14 jun. 2023.

TAUFER, Nathali Parise. **Influência do Vírus da Zika Sobre a via de Sinalização Coordenada Pelos Fatores de Transcrição Six1 e Six2 no Desenvolvimento Cerebral Inicial**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) - Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.

TEOH, Boon Teong *et al.* A Teverse Transcription Loop-mediated Isothermal Amplification for Broad Coverage Detection of Asian and African Zika Virus Lineages. **BMC Infectious Diseases**, Berlin, v. 20, n. 1, p. 1–10, 2020. DOI: 10.1186/S12879-020-05585-4/FIGURES/4. Disponível em: <https://bmcinfectdis.biomedcentral.com/articles/10.1186/s12879-020-05585-4>. Acesso em: 19 jun. 2023.

THAWANI, Ankita *et al.* Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. **Cell reports**, Cambridge, v. 23, n. 3, p. 692, 2018. DOI: 10.1016/J.CELREP.2018.03.080. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6082411/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30000000/). Acesso em: 9 jun. 2023.

THOMPSON, Dorian; LEI, Yu. Mini Review: Recent Progress in RT-LAMP Enabled COVID-19 Detection. **Sensors and Actuators Reports**, Amsterdam, v. 2, n. 1, p. 100017, 2020. DOI: 10.1016/J.SNR.2020.100017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC7428436/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32000000/). Acesso em: 1 jun. 2023.

TRAINOR, Paul A.; KRUMLAUF, Robb; BRONNER-FRASER, Marianne. Neural Crest Cells. **Handbook of Stem Cells**, Amsterdam, v. 2, p. 205–218, 2004. DOI: 10.1016/B978-012436643-5/50109-7.

TSAI, Hwei Mei; GARBER, Beatrice B.; LARRAMENDI, Luis H. 3H-Thymidine Autoradiographic Analysis of Telencephalic Histogenesis in the Chick Embryo: II. Dynamics of Neuronal Migration, Displacement, and Aggregation. **The Journal of Comparative Neurology**, [S.l.], v. 198, n. 2, p. 293–306, 1981. DOI:10.1002/cne.901980208. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/cne.901980208>. Acesso em: 23 set. 2023.

UNCINI, Antonino; SHAHRIZAILA, Nortina; KUWABARA, Satoshi. Zika Virus Infection and Guillain-Barré Syndrome: A Review Focused on Clinical and Electrophysiological Subtypes. **Journal of Neurology, Neurosurgery & Psychiatry**, London, v. 88, n. 3, p. 266–271, 2017. DOI: 10.1136/JNNP-2016-314310.

VALENTE, Ana Paula; MORAES, Adolfo Henrique. Zika Virus Proteins at an Atomic Scale: How Does Structural Biology Help Us to Understand and Develop Vaccines and Drugs Against Zika Virus Infection? **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 25, 2019. DOI: 10.1590/1678-9199-JVATITD-2019-0013. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6727858/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32000000/). Acesso em: 13 jun. 2023.

VIRALZONE. **Zika Vírus**. [s.d.]. Disponível em: https://viralzone.expasy.org/6756.html?outline=all_by_species. Acesso em: 13 jun. 2023.

VUE, Dallas; TANG, Qiyi. Zika Virus Overview: Transmission, Origin, Pathogenesis, Animal Model and Diagnosis. **Zoonoses**, Burlington, v. 1, n. 1, 2021. DOI: 10.15212/ZOONOSES-2021-0017.

WACHHOLZ, Gabriela Elis *et al.* Zika Virus-induced Brain Malformations in Chicken Embryos. **Birth Defects Research**, New York, v. 113, n. 1, p. 22–31, 2021. DOI: 10.1002/BDR2.1813. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/bdr2.1813>. Acesso em: 9 jun. 2023.

WANG, Guoping *et al.* Unusual Isothermal Multimerization and Amplification by the Strand-Displacing DNA Polymerases with Reverse Transcription Activities. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 7, n. 1, 2017. DOI: 10.1038/S41598-017-13324-0. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5654958/](https://pmc/articles/PMC5654958/). Acesso em: 7 jun. 2023.

WATSON, Maggie J. A Blood Sampling Technique for Prehatched Chicks. **Journal of Field Ornithology**. [S.l.], v.83, n. 4, p. 407–411, 2012. DOI: 10.1111/j.1557-9263.2012.00391.x. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1557-9263.2012.00391.x>. Acesso em: 23 set. 2023.

WERNER, Heron *et al.* First-trimester Intrauterine Zika Virus Infection and Brain Pathology: Prenatal and Postnatal Neuroimaging Findings. **Prenatal Diagnosis**, [S. l.], v. 36, n. 8, p. 785–789, 2016. DOI: 10.1002/PD.4860. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/pd.4860>. Acesso em: 19 jun. 2023.

WHO. World Health Organization. **Zika Virus Disease Outbreak 2015-2016**. 2016. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/situations/zika-virus-outbreak>. Acesso em: 15 jun. 2023.

WHO. World Health Organization. **Zika Virus**. 2022. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/zika-virus>. Acesso em: 31 maio. 2023.

WU, Shanshan *et al.* Nervous System Injury and Neuroimaging of Zika Virus Infection. **Frontiers in Neurology**, Lausanne, v. 9, n. APR, p. 351021, 2018. DOI: 10.3389/FNEUR.2018.00227/BIBTEX. Acesso em: 10 jun. 2023.

XIMENES, Ricardo Arraes de Alencar *et al.* Risk of Adverse Outcomes in Offspring with RT-PCR Confirmed Prenatal Zika Virus Exposure: An Individual Participant Data Meta-Analysis of 13 Cohorts in the Zika Brazilian Cohorts Consortium. **Lancet Regional Health - Americas**, London, v. 17, p. 100395, 2023. DOI: 10.1016/J.LANA.2022.100395. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9880800/](https://pmc/articles/PMC9880800/). Acesso em: 17 maio. 2023.

XU, Dan *et al.* Update on the Animal Models and Underlying Mechanisms for ZIKV-Induced Microcephaly. **Annual Review**, San Mateo, v. 6, p. 459–479, 2019. DOI: 10.1146/ANNUREV-VIROLOGY-092818-015740. Disponível em: <https://www.annualreviews.org/doi/abs/10.1146/annurev-virology-092818-015740>. Acesso em: 14 jun. 2023.

YAN, Yuqi *et al.* Zika Virus Induces Abnormal Cranial Osteogenesis by Negatively Affecting Cranial Neural Crest Development. **Infection, Genetics and Evolution**,

Amsterdam, v. 69, p. 176–189, 2019. a. DOI: 10.1016/J.MEEGID.2019.01.023. Acesso em: 22 jun. 2023.

YAN, Zhihong *et al.* Meteorological Factors Affecting Pan Evaporation in the Haihe River Basin, China. **Water**, Basel, v. 11, n. 2, p. 317, 2019. DOI: 10.3390/W11020317. Disponível em: <https://www.mdpi.com/2073-4441/11/2/317/htm>. Acesso em: 9 maio. 2023.

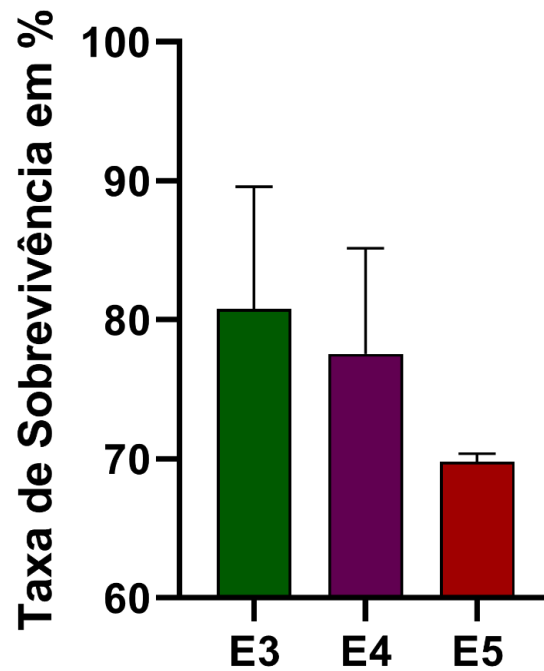
YE, Qing *et al.* Genomic Characterization and Phylogenetic Analysis of Zika Virus Circulating in the Americas. **Infection, Genetics and Evolution: Journal of Molecular Epidemiology and Evolutionary Genetics in Infectious Diseases**, Amsterdam, v. 43, p. 43–49, 2016. DOI: 10.1016/J.MEEGID.2016.05.004. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27156653/>. Acesso em: 13 jun. 2023.

ZHOU, Kehui *et al.* Current Progress in the Development of Zika Virus Vaccines. **Vaccines**, Basel, v. 9, n. 9, 2021. DOI: 10.3390/VACCINES9091004.

APÊNDICES

APÊNDICE A – SOBREVIVÊNCIA DOS EMBRIÕES

Figura 26 - Gráfico do índice de sobrevivência dos embriões realizados nesse estudo e nos estudos do grupo



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Esse gráfico mostra a taxa de sobrevivência dos embriões que foram manipulados nos estudos. Nessa análise ainda não tinha sido realizado os diagnósticos. Os embriões em E3, foram testes realizados pelo grupo. Teste de anova com o valor de $p = 0,3237$.

APÊNDICE B – NÚMERO DOS EMBRIÕES POSITIVOS

Tabela 5 - Número de embriões positivos por grupo de infecção

Grupo	Idade	Embriões inoculados inicialmente	Embriões inoculados sobreviventes após 24h	Embriões positivos	Taxa de Positivos
G1	E4	11	9	2	22,22%
	E5	17	13	12	92,31%
G2	E4	11	9	2	22,22%
	E5	17	14	10	71,43%
G3	E4	9	6	3	50,00%
	E5	15	6	4	66,67%
G4	E4	18	14	6	42,86%
	E5	17	13	10	76,92%
G5*	E5	18	13	10	76,92%
G6	E4	15	13	4	30,77%
	E5	10	7	6	85,71%

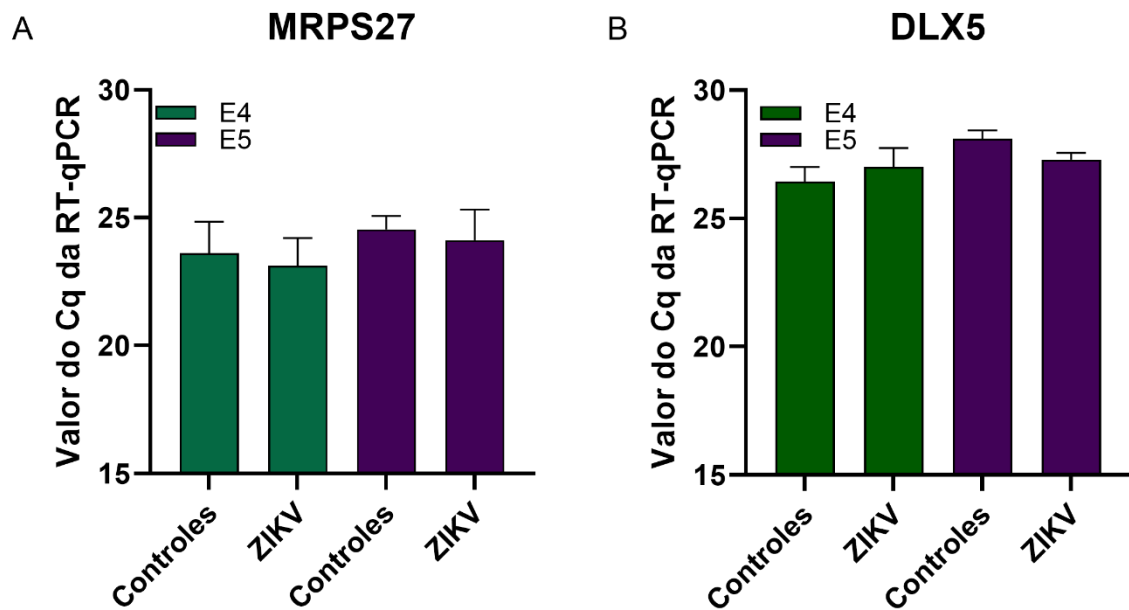
Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Todos os embriões que foram manipulados com ZIKV nesse estudo. Embriões de E3 não entraram nessa tabela, pois não foi realizado nenhum teste com esses embriões.

Observação* - O Grupo G5 apresenta a apenas a idade E5, pois houve uma contaminação apenas nessa idade, por esses motivos ele foi retirado das análises.

APÊNDICE C – ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS GENES DE REFERÊNCIA

Figura 27 - Gráfico dos genes de referência

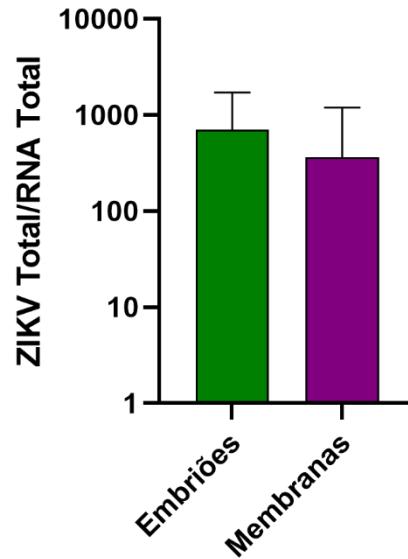


Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Gráfico das análises do Cq dos embriões controles e infectados, nas idades E4 e E5 mostrando que os genes usados como referência não apresentam diferença estatística quando testados os embriões controles em comparação com os infectados com ZIKV. A – Embriões analisados para o gene MRPS27. B – Embriões analisados para o gene DLX5. Teste realizado Kruskal=Wallis, com valor de $p = 0,0008$.

APÊNDICE D – ANÁLISE ESTATÍSTICA DAS MEMBRANAS E EMBRIÕES INTEIROS

Figura 28 - Análise da carga viral das membranas e embriões



Fonte: Elaborado pelo autor.

Legenda: Análise estatística entre os grupos dos embriões inteiros e suas respectivas membranas. As análises não apresentaram diferença significativa entre os grupos analisados. Teste utilizado Mann-Whitney com o valor de $p = 0,7984$