



A infecção parental pelo vírus Zika altera o processo de ossificação do esqueleto fetal

Silva, ALA¹; Silva, AA²; Dias, FCR³; Guimarães, PO²; Brayner, FA²; Alves, LC².

¹Departamento de Bioquímica da UFPE, Recife - PE.

²Departamento de Parasitologia da FIOCRUZ, Recife - PE.

³Departamento de Ciências Naturais da UFSJ, São João Del Rei - MG.

Eixos temáticos: Microbiologia (infecções bacterianas, virais e fúngicas).

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um parasita intracelular obrigatório carregado por fêmeas do mosquito *Aedes aegypti* e transmitido ao ser humano. As formas de transmissão pelo ZIKV incluem: transmissão vetorial, vertical e sexual. O hospedeiro final pode apresentar a morfologia citológica do trato reprodutivo e do sistema nervoso central (SNC) alterada pela infecção do ZIKV. Os achados clínicos são semelhantes a outras arboviroses, sendo na maioria dos casos assintomática. Atualmente, a possibilidade de acometimento patológico em outros tecidos tem sido pesquisada através de estudos experimentais. O presente trabalho buscou analisar a formação do esqueleto fetal em camundongos balb/c infectados verticalmente. Camundongos Balb/c foram distribuídos em grupos experimentais de machos imunodeprimidos e imunodeprimidos infectados, e acasalados com fêmeas saudáveis. Foram coletados os fetos para análise do peso, medidas morfométricas (diâmetro cefálico, comprimento do tronco e da cauda) e contagem dos centros de ossificação após diafanização e coloração por vermelho de alizarina e azul de alcian, e os dados foram analisados pelo teste t de Student ($p \leq 0,05$) no software Past v.2.17c. Desse modo, o acometimento fetal pela infecção vertical do vírus pode prejudicar a formação dos centros de ossificação primários e o desenvolvimento ósseo do feto.

Palavras-chave: Vírus Zika; Infecção vertical; Desenvolvimento fetal.

Agências Financiadoras: Instituto Aggeu Magalhães (IAM-FIOCRUZ) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Ensino Superior (CAPES).

INTRODUÇÃO

O ZIKV é um vírus de ácido ribonucleico (RNA) de fita simples e sentido positivo, pertencente ao gênero flavivírus, família *Flaviviridae*. A partícula viral é constituída de um arranjo de glicoproteínas de superfície prM e E, que se rearranjam na bicamada fosfolipídica nos períodos de replicação viral; sua estrutura possui proteínas não estruturais, que participam na cadeia de montagem e replicação. O ZIKV se adaptou a diferentes vetores artrópodes ao longo de sua distribuição pelos trópicos, sendo eles distintos entre si na África, América do Sul, Sudeste Asiático e na região do Pacífico. Na América do Sul a transmissão acontece principalmente pelo mosquito *Aedes aegypti*, sendo essas fêmeas infectadas com o ZIKV (Sirohi & Kuhn, 2017).

No ano de 1947 em Uganda, ao conduzir vigilância de rotina do vírus causador da febre amarela, cientistas isolaram pela primeira vez, em um macaco rhesus sentinela, o ZIKV. A partir de 1952 houve a detecção de anticorpos neutralizantes no soro de humanos com a expansão do vírus para a África equatorial e posteriormente para a Ásia. Entre 2015 e 2016, houve uma emergência internacional acerca da velocidade em que o vírus se espalhava pela América, registrando cerca de 900.000 casos (Hennessey, 2016).

Predominantemente, existem três formas de transmissão pelas quais o ZIKV acomete a população: a transmissão vetorial, a transmissão vertical e a transmissão sexual. Em relação ao aspecto clínico, os pacientes infectados pelo vírus podem ser sintomáticos ou assintomáticos, podendo apresentar febre baixa ($\leq 38,5$ °C), cefaleia, exantema, astenia, artralgia, mialgia, além dos recentes achados no trato reprodutivo, como a orquite. As manifestações tendem a ser similares a outras arboviroses, sendo necessário, muitas vezes, o diferenciamento laboratorial. Com a epidemia pelo ZIKV a partir de 2015, houve o aumento do número de casos de microcefalia congênita e o desenvolvimento neurológico anormal de recém-nascidos, os estudos mostraram um tropismo do ZIKV pelas células-tronco progenitoras neuronais, produzindo uma resposta inflamatória deletéria que compromete o desenvolvimento do SNC do feto (Miranda et al., 2021; Filgueiras et al., 2021).

O ZIKV infecta o trato reprodutivo masculino e seu RNA persiste no testículo mesmo após a depuração do vírus no sangue periférico. Passada a infecção, a expressão de proteínas nas zonas de oclusão, entre as células de Sertoli, é regulada negativamente, possibilitando a invasão através da barreira hematotesticular de macrófagos com tropismo para o ZIKV, levando ao aumento da expressão de células pró-inflamatórias que lesionam os testículos (Yang et al., 2024).

Além dos danos já conhecidos provocados pela viremia do Zika, como no SNC e no trato reprodutivo masculino, há, também, novos estudos que investigam a repercussão do vírus em outros tecidos. Em relação ao tecido ósseo, Mumtaz et al. (2022) sugeriram que o ZIKV pode influenciar a maturação de osteoblastos e a formação dos ossos cranianos pela infecção de células da crista neural. Nesse sentido, o presente estudo tem por objetivo analisar a influência da infecção vertical de camundongos balb/c sobre o desenvolvimento ósseo dos fetos.

MATERIAIS E MÉTODOS

Para a execução do experimento os animais adultos (camundongos adultos de linhagem balb/c) foram randomicamente divididos em 2 grupos (10 fêmeas sadias e 5 machos que sofreram intervenções): Grupo macho imunodeprimido e grupo macho imunodeprimido e infectado. Para cada fêmea prenhe foram coletados em média 6 fetos, totalizando uma média de 60 fetos por grupo.

Os animais fêmeas prenhes foram pesados e anestesiados com pentobarbital sódico (Nembutal®) a 50mg/kg em 0,3ml de água para injeção. Os fetos presentes nos cornos uterinos das fêmeas prenhes foram coletados, pesados e fixados em solução de álcool etílico a 92%.

Foram obtidos o diâmetro cefálico (resultado da média dos eixos látero-lateral e ântero-posterior da cabeça do animal), o comprimento do tronco e da cauda dos fetos através da utilização de um paquímetro analógico MTX® (0,02 - 200mm).

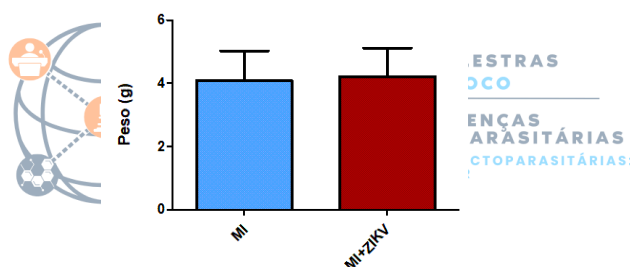
Os fetos foram processados para avaliação do esqueleto através da técnica de diafanização com marcação do esqueleto. Após 48 horas, tiveram a pele removida por dissecação com bisturi, bem como as vísceras presentes nas cavidades torácica, abdominal e pélvica. Em seguida os espécimes foram imersos em acetona para remoção dos lipídios e posteriormente imersos em solução alcoólica de vermelho de alizarina e azul de alcian durante 72 horas, para marcação dos ossos e das cartilagens. Por fim foram imersos em solução aquosa de hidróxido de potássio a 2% para clarificação dos tecidos moles não corados.

Os resultados das análises foram submetidos ao teste t student através do software Past v.2.17c. Os dados foram expressos em média \pm desvio padrão, sendo considerado o valor de $p \leq 0.05$.

RESULTADOS E DISCUSSÕES

O peso corporal médio dos fetos não apresentou alterações (Figura 1).

Figura 1— Peso corporal dos fetos

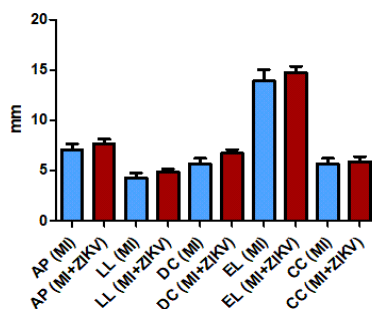


Fonte: O autor

Legenda: MI - Grupo Macho imunodeprimido; MI+ZIKV - Grupo macho imunodeprimido e infectado com vírus Zika. ($P \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

A morfometria corporal não apontou variações significativas nos eixos látero-lateral e anteroposterior da cabeça (Figura 2). Também não houveram alterações do diâmetro cefálico, no comprimento do eixo longitudinal ou na cauda dos fetos.

Figura 2 — Morfometria corporal dos fetos



Legenda: AP – Eixo ântero-posterior; LL – Eixo látero-lateral; DC – Diâmetro cefálico; EL – Eixo longitudinal; CC – Comprimento da cauda; MI – Grupo Macho imunodeprimido; MI+ZIKV – Grupo macho imunodeprimido e infectado pelo vírus Zika. ($P \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Fonte: O autor.

Os centros de ossificação do esqueleto fetal apresentaram variações no osso esterno (Tabela 1 e figura 3), representando uma redução de 85,9% dos centros de ossificação.

Tabela 1 — Contagem do número de centros de ossificação do esqueleto fetal

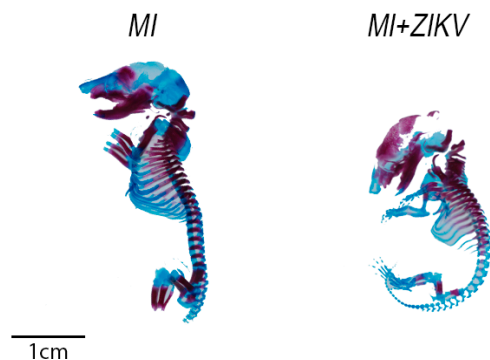
Agrupamento Ósseo	Grupos experimentais	
	MI	MI+ZIKV
Vértebras	30,44±3,69	28,11±0,98
Costela	24,11±1,84	25,78±0,69
Esterno	0,78±0,35	0,11±0,10*

Legenda: MP – Grupo macho placebo; MI – Grupo Macho imunodeprimido; MI+ZIKV – Grupo macho imunodeprimido e infectado pelo vírus Zika. Letras distintas sobrescritas aos resultados quantitativos, entre os grupos experimentais, diferem estatisticamente entre si ($P \leq 0,05$) (Student Newman Keuls).

Fonte: O autor.

O osso esterno é um importante componente do esqueleto, sendo o responsável por ancorar as costelas anteriormente, no esqueleto axial. O conjunto de costelas e do osso esterno formam a chamada “caixa torácica” ou “gradil costal”, estrutura complexa responsável pela proteção física dos órgãos torácicos e também por fornecer suporte mecânico para a ventilação pulmonar. Um comprometimento desta estrutura poderia causar disfunções severas aos pulmões e reduzir a proteção mecânica dos órgãos, como relatado por Storoni e colaboradores (2021).

Figura 3 — Esqueleto fetal marcado com a técnica de diafanização (Machos manipulados)



Legenda: MI – Grupo Macho imunodeprimido; MI+ZIKV – Grupo macho imunodeprimido e infectado pelo vírus Zika.

Fonte: O autor.

CONCLUSÃO

Os dados obtidos sugerem que a infecção parental por vírus Zika pode retardar o desenvolvimento do esqueleto fetal, através da diminuição do número de centros de ossificação, como o que ocorreu com o osso esterno.

REFERÊNCIAS

- FILGUEIRAS, I. S. et al. **The clinical spectrum and immunopathological mechanisms underlying ZIKV-induced neurological manifestations.** *PLOS Neglected Tropical Diseases*, v. 15, n. 8, 2021.
- HENNESSEY, M. et al. **Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016.** *Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR)*, v. 65, n. 3, p. 55–58, 2016.
- MIRANDA, C. C. S. et al. **Características epidemiológicas dos casos de Zika Vírus do estado do Piauí.** *Revista de Casos e Consultoria*, v. 12, n. 1, p. e27450, 2021.
- MUMTAZ, N. et al. **Zika virus infects human osteoclasts and blocks differentiation and bone resorption.** *Emerging Microbes & Infections*, v. 11, n. 1, p. 1621–1634, 2022.
- SIROHI, D.; KUHN, R. J. **Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors.** *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. suppl_10, p. S935–S944, 15 dez. 2017.
- STORONI, S. et al. **Pathophysiology of respiratory failure in patients with osteogenesis imperfecta: a systematic review.** *Annals of Medicine*, v. 53, n. 1, p. 1676–1687, 2021.
- YANG, W. et al. **Immunocompetent mouse models revealed that S100A4+ monocytes/macrophages facilitate long-term Zika virus infection in the testes.** *Emerging Microbes & Infections*, v. 13, n. 1, p. 2300466, 2024.