

Projetos de Iniciação Científica para o Programa PIBIC - CNPEM

Biologia da Infecção pelo vírus Zika: Impacto no desenvolvimento do sistema nervoso de embriões de camundongos

Pesquisador responsável: Dr. Murilo Carvalho (LNBio / CNPEM)

Pesquisador líder: Dr. José Xavier Neto (LNBio / CNPEM)

Campinas, SP

Abril 2017

INTRODUÇÃO

Em abril de 2015, o ZIKV foi identificado como o agente etiológico do surto de doença exantemática iniciado no final de 2014 em estados do nordeste brasileiro. Em novembro de 2015, o Ministério da Saúde reconheceu o aumento de casos de microcefalia nas áreas afetadas e a sua associação com a infecção por ZIKV [1], enquanto que a associação entre a paralisia ascendente de Guillan-Barré e ZIKV foi oficialmente confirmada em dezembro de 2015. Estas manifestações neurológicas evidenciam o grave potencial patogênico do ZIKV.

A perspectiva de intensificação dos surtos de infecção por ZIKV, e do consequente aumento do número de indivíduos afetados por complicações graves e incapacitantes, prenuncia um severo problema de saúde pública a reclamar, com extrema urgência, seu enfrentamento em diversos níveis. Como consequência da gravidade da situação, a mobilização da Ciência Nacional e Internacional já é intensa. Desde o início da epidemia, o LNBio/CNPEM delibera sobre os contextos específicos nos quais poderia aplicar suas competências complementares para fazer avançar, do modo mais efetivo, um programa coletivo de investigação.

O ZIKV é um RNA vírus da família flaviviridae, que inclui também os vírus da Dengue (DENV), da Febre Amarela, do West Nile (WNV), da Encefalite Japonesa (JEV) e outros. O genoma de ZIKV contém 10,794 nucleotídeos, que codificam 3.419 aminoácidos. ZIKV é filogeneticamente mais próximo ao vírus Spondweni, que com ele constitui os dois únicos membros de seu grupo dentro da clade de flavovírus transmitidos por mosquitos [2]. O genoma de ZIKV é um RNA de sentido (+), que ao entrar na célula funciona como RNA mensageiro para sintetizar uma poliproteína que é subsequentemente clivada, formando 3 proteínas estruturais e 7 não estruturais. Além de codificar proteínas virais, o RNA mensageiro também pode apresentar outras sequências regulatórias para alterar ou interferir na expressão gênica da célula hospedeira e favorecer a infecção viral. Em decorrência de seu genoma ser constituído por uma fita de sentido + de RNA, a replicação viral ocorre no citoplasma, mais especificamente no retículo endoplasmático rugoso, que é rico em ribossomos que ligam o RNA de ZIKV através de seu capuz de metilguanossina. Incidentalmente, o capuz de metilguanossina de flavivírus parece ser importante para o desenvolvimento de terapias. No contexto específico da replicação de WNV em células, já há evidências de que as enzimas responsáveis pela metilação do capuz são alvos em potencial para o desenvolvimento de terapias [3]. Embora o *locus* celular primário de ZIKV seja o citoplasma, há a sugestão de que ele também pode ser encontrado no núcleo [4].

Os flavivírus transmitidos por mosquitos geralmente replicam inicialmente em células dendríticas na vizinhança do sítio de inoculação, de onde se espalham para os linfonodos e, finalmente, entram na corrente sanguínea. O período de incubação para ZIKV ainda não foi determinado com segurança, mas parece variar entre alguns dias a uma semana. O período de viremia do ZIKV parece variar entre o primeiro dia e o décimo primeiro dia após o início dos sintomas [5].

O ZIKV pode apresentar tropismo por células do sistema nervoso e habilidade para cruzar tanto a barreira placentária, quanto a hematoencefálica [6, 7]. Neurotropismo e capacidade de transpor a barreira placentária não são estranhos aos flavivírus, e estas habilidades já foram descritas para o WNV [8] e para o JEV, que apresenta neurotropismo diferencial em função do grau de maturidade neuronal [9]. Em adição ao dano neural direto, ainda é possível que a replicação de um flavivírus como ZIKV possa induzir dano secundário através da indução de quimiocinas inflamatórias, que estimulam a migração de células do sistema imune para o tecido nervoso [10, 11].

Dados da literatura demonstram que o genoma viral de outro flavivírus, o WNV pode codificar sequências de microRNA que apresentam importância na infecção de células de inseto. No caso do vírus JEV, foi descrita uma correlação entre a atividade de microRNAs endógenos e o processo infeccioso viral no hospedeiro humano [12, 13]. De outra forma, também são descritos mecanismos de restrição do processo infeccioso, mediados por microRNAs que inativam sequências virais, como demonstrado em modelos experimentais de infecção por DENV [14]. Estes experimentos sugerem que a expressão gênica na célula hospedeira pode ser modulada de modo a limitar a infecção por flavivírus através de mecanismos de regulação pós-transcricional mediados por microRNA, o que abre possibilidades interessantes que serão exploradas neste projeto.

Estado da arte sobre a microcefalia associada a ZIKV

Atualmente parece haver, se não um consenso em formação, pelo menos uma forte inclinação pela ideia de que a microcefalia associada ao ZIKV se relaciona diretamente à ação viral, embora não se possa descartar fatores moduladores. De fato, já se demonstrou a presença de ZIKV vírus no líquido amniótico e em lesões cerebrais em conceito portador de microcefalia [15, 16]. Do ponto de vista biológico a ação de ZIKV sobre o sistema nervoso em desenvolvimento não é nem mesmo insólita entre os flavivírus, uma vez que já se documentou a transposição da barreira placentária pelo JEV e WNV [8, 9]. Mais notável ainda parece ser a conservação das estratégias virais de agressão ao

sistema nervoso do conceito. Tanto em infecções por CMV e pelo vírus da Rubéola em humanos, quanto na infecção experimental por vírus da Coriomeningite Linfocítica em ratos, o alvo parece ser as células progenitoras neurais da região subventricular, com, possivelmente um componente de desorganização da migração dos neuroblastos através da glia radial [17].

O embrião de camundongo: o modelo primário

O camundongo (*Mus musculus*) é um mamífero muito utilizado como modelo animal devido as suas similaridades biológicas que o aproxima do homem (incluindo eventos morfogenéticos similares). Em uma recente contribuição, nossa equipe descreveu um modelo animal, usando camundongos imunocompetentes, que reflete com a máxima fidelidade possível a condição humana [18]. Nesse estudo, detalhamos a janela do desenvolvimento mais crítica para o embrião, na qual o impacto da infecção pelo ZIKV causa os maiores danos. Adicionalmente, padronizamos uma rota de inoculação do vírus e a quantidade de vírus a ser injetada no animal de modo que o ZIKV alcance as placentas e, eventualmente, os embriões. Por fim, mostramos os acometimentos aos embriões malformados, incluindo problemas de posturas de articulação (i.e. artrogripose) e aqueles associados diretamente ao sistema nervoso central, como hidrocefalia e falha de fechamento do tubo neural.

Durante a formação do embrião, a correta diferenciação e posterior fechamento do tubo neural é responsável pela divisão das três vesículas encefálicas primitivas: o prosencéfalo, o mesencéfalo, e o rombencéfalo. Respectivamente, irão originar o telencéfalo (hemisférios cerebrais), o diencéfalo (subtálamo, hipotálamo, tálamo e epitálamo), a protuberância e o bulbo raquidiano.

O lúmen do tubo neural nunca desaparece durante o desenvolvimento sendo responsável pelo surgimento das cavidades do sistema nervoso central, com destaque para os ventrículos. Esse sistema integra as cavidades intra-encefálicas, comunicantes entre si e contínuas com o canal central da medula espinhal. No telencéfalo, as cavidades são os ventrículos laterais; no diencéfalo, o terceiro ventrículo; no mesencéfalo, o aqueduto de Sylvius, que é o canal de comunicação entre o terceiro e quarto ventrículos. Este, por sua vez, localizado entre a protuberância e parte do bulbo.

OBJETIVOS

OBJETIVO GERAL

Avançar o conhecimento sobre os mecanismos de desenvolvimento neural afetados pela infecção por ZIKV

OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- A- Estudar em detalhes histológicos o sistema nervoso em desenvolvimento de embriões cujas mães receberam ZIKV e compará-los aos embriões controle (injeção de PBS)
- B- Determinar o impacto do ZIKV diretamente nas células precursoras do sistema nervoso
- C- Determinar se há prejuízo na formação do sistema ventricular

METODOLOGIA

Conforme mencionado, já possuímos o modelo animal em camundongos para estudos da biologia da infecção do ZIKV durante o desenvolvimento embrionário. Nesse sentido, os embriões obtidos, majoritariamente de linhagem FVB/NJ, serão devidamente fixados e preparados para análise com diferentes técnicas. Estas envolvem as técnicas tradicionais de histologia com marcações para padrões morfológicos (e.g. colocação com hematoxilina e eosina) até marcações específicas para o material genético do vírus (e.g. hibridação *in situ*) ou suas proteínas (e.g. imunohistoquímica/fluorescência). Adicionalmente, serão usadas técnicas mais sofisticadas de imagens tridimensionais com o uso de microtomografias com alta resolução utilizando luz síncrotron. Estas últimas serão feitas em colaboração com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS/CNPEM).

Após as preparações e/ou medições nas linhas de luz síncrotron, as imagens geradas serão analisadas em computador com softwares específicos (e.g. Amira/Avizo, VG Studio) para estabelecermos níveis precisos do impacto do ZIKV nos tecidos precursores do sistema nervoso do embrião. Esse processo envolve o trabalho de segmentação tridimensional tanto dos precursores nervosos quanto do lúmen do tubo neural.

Assim será possível entendermos o processo de fechamento normal do tubo neural em um espaço tridimensional e, conseqüentemente, poderemos avaliar o impacto do ZIKV na segmentação, assim como as conseqüências para a correta formação do sistema nervoso central.

As metodologias, em maior detalhe, estão especificadas no anexo do presente projeto.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ministério da Saúde, B., *Microcefalia - Ministério da Saúde divulga boletim epidemiológico*. 2015.
2. Kuno, G., et al., *Phylogeny of the genus Flavivirus*. Journal of virology, 1998. **72**: p. 73-83.
3. Dong, H., et al., *Structural and functional analyses of a conserved hydrophobic pocket of flavivirus methyltransferase*. Journal of Biological Chemistry, 2010. **285**: p. 32586-32595.
4. Buckley, A. and E.A. Gould, *Detection of virus-specific antigen in the nuclei or nucleoli of cells infected with Zika or Langkat virus*. Journal of General Virology, 1988. **69**: p. 1913-1920.
5. Ioos, S., et al., *Current Zika virus epidemiology and recent epidemics*. Medecine et Maladies Infectieuses, 2014. **44**: p. 302-307.
6. Chaturvedi, U.C., et al., *Breakdown of the blood-brain barrier during dengue virus infection of mice*. J Gen Virol, 1991. **72 (Pt 4)**: p. 859-866.
7. Chambers, T.J. and M.S. Diamond, *Pathogenesis of flavivirus encephalitis*. Advances in virus research, 2003. **60**: p. 273-342.
8. Sirois, P.A., et al., *Developmental Outcomes in Young Children Born to Mothers with West Nile Illness during Pregnancy*. Birth Defects Research Part A - Clinical and Molecular Teratology, 2014. **100**: p. 792-796.
9. Ogata, A., et al., *Japanese encephalitis virus neurotropism is dependent on the degree of neuronal maturity*. Journal of virology, 1991. **65**: p. 880-6.
10. Ben-Nathan, D., et al., *West Nile virus neuroinvasion and encephalitis induced by macrophage depletion in mice*. Archives of Virology, 1996. **141**: p. 449-469.
11. Despres, P., et al., *Apoptosis in the mouse central nervous system in response to infection with mouse-neurovirulent dengue viruses*. J Virol, 1998. **72**: p. 823-829.
12. Chen, Z., et al., *miR-33a-5p modulates Japanese Encephalitis Virus Replication by targeting Eukaryotic Translation Elongation Factor 1A1*. Journal of Virology, 2016: p. JVI.03242-15.
13. Zhu, B., et al., *MicroRNA-15b Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF125*. The Journal of Immunology, 2015. **195**: p. 2251-2262.
14. Tsetsarkin, K.A., et al., *Dual miRNA Targeting Restricts Host Range and Attenuates Neurovirulence of Flaviviruses*. PLoS Pathogens, 2015. **11**: p. 1-22.
15. Calvet, G., et al., *Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study*. The Lancet Infectious Diseases, 2016. **3099**: p. In press.
16. Mlakar, J., et al., *Zika Virus Associated with Microcephaly*. New England Journal of Medicine, 2016: p. 160210140106006.
17. Bonthius, D.J. and S. Perlman, *Congenital viral infections of the brain: Lessons learned from lymphocytic choriomeningitis virus in the neonatal rat*. PLoS Pathogens, 2007. **3**: p. 1541-1550.
18. Xavier-Neto, J., et al., *Hydrocephalus and arthrogryposis in an immunocompetent mouse model of ZIKA teratogeny: A developmental study*. PLOS Neglected Tropical Diseases, 2017. **11(2)**: p. e0005363.

ANEXO

Detalhes Metodológicos

Processamento histológico: embriões cujas mães foram infectadas com ZIKV e embriões de fêmeas controle (que receberam somente PBS) serão fixados em paraformaldeído (PFA) 4% (podendo conter glutaraldeído a 2,5%) , por 12 horas, a 4° C, lavados em PBS 1X (ou cacodilato 0,1M) (3 vezes, 5 minutos cada), desidratados em bateria crescente de etanol (70%, 80%, 90%, 95% e 100%, 30 minutos cada), diafanizados em xilol (ou citrisolv) (3 banhos de 30 minutos cada) e emblocados em paraplast (3 banhos de 45 minutos cada). O material emblocado será seccionado em cortes com 8µm de espessura e estes colocados em lâminas Superfrost Plus (FisherScientific #1255015). No caso de embriões a serem levados para medidas por tomografia com luz sincrotron, os mesmos serão mantidos em etanol 100% para posterior tratamento com agentes de contraste (e.g. teróxido de ósmio, acetato de uranila, citrato de chumbo).

Coloração por hematoxilina e eosina: Após o processamento histológico, os cortes que serão submetidos à análise morfológica comparativa para identificar alterações teciduais decorrentes da ação de ZIKV serão corados por hematoxilina e eosina. Para tanto, os cortes serão desparafinizados em xilol (dois banhos de 15 minutos, cada), reidratados em bateria decrescente de etanol (100%, 95%, 80%, 70%) por 5 minutos cada lavagem, corados em hematoxilina por 3 minutos, lavados em água corrente, corados em eosina por 7 minutos, novamente lavados em água corrente, para em seguida serem desidratados em bateria crescente de etanol (70%, 80% , 90%, 100%) por 5 minutos cada lavagem, diafanizados em xilol (duas lavagens de 5 minutos cada) e montados em Permount (FisherScientific #SP15-500).

Hibridação in situ: A Hibridação *in situ* em embriões inteiros de camundongo e será realizada de acordo com Wilkinson, usando sondas marcadas com Dioxigenina [19]. Hibridações *in situ* duplas serão realizadas em embriões inteiros com sondas marcadas com Dioxigenina e Fluoresceína como descrito por [20].

Ensaio de Imunohistoquímica em cortes histológicos: Ensaio de imunohistoquímica serão realizados em cortes do cérebro de embriões de animais modelo. Primeiramente, os cortes serão desparafinizados em 2 banhos de xilol, de 15 minutos cada e reidratados em bateria decrescente de

etanol (100%, 95%, 80%, 70% e água destilada), por 5 minutos cada lavagem. Em seguida, os cortes serão tratados com solução tampão citrato pH 6,0 a 79°C, por 20 minutos, para exposição do epítipo (em Panela Elite Platinum). Então serão lavados em PBS 0,1M pH 6,8. O material passará por uma etapa de bloqueio da peroxidase endógena, através de incubação em metanol (1:99), por 15 minutos. Os cortes serão então lavados com PBS 0,1M pH 6,8. Em seguida será realizada uma etapa de lavagem com glicina 0,1 M em PBS 0,1M, por 10 minutos, para impedir a autofluorescência. Os cortes serão então lavados em PBS 0,1M pH 6,8 e incubados em Soro de Albumina Bovina (BSA) 1% por 30 minutos, para bloquear a ligação do anticorpo a sítios inespecíficos. O material passará por uma etapa de bloqueio de avidina e biotina, de 15 minutos cada (Avidin/ Biotin Blocking Kit Vector). Os cortes serão lavados em PBS 0,1M pH 6,8. O anticorpo primário, diluído em BSA 0,1% (1:100) será aplicado sobre os cortes que permanecerão a 4°C, em câmara úmida durante a noite. No dia seguinte, os cortes serão lavados em PBS 0,1M pH 6,8 e incubados em anticorpo biotilado (1:200) diluído em BSA 1%, por 1 hora. Os cortes serão lavados em PBS 0,1M pH 6,8 e novamente bloqueados em BSA 1%, por 30 minutos a temperatura ambiente. Em seguida, será realizada mais uma lavagem em PBS 0,1M pH 6,8 e o anticorpo anti streptoavidina fluorescente (diluição 1:800) será incubado, durante 1 hora, em temperatura ambiente e câmara úmida e escura. Os cortes serão lavados em PBS 0,1M pH 6,8 e incubados com *Hoechst* 3325 (20 µg/ml), por 30 minutos, lavados novamente em PBS 0,1M pH 6,8 (por 3 vezes de 10 minutos cada) e as lâminas serão montadas com Fluorescent Mounting Medium (Dako #S3023). Os cortes serão analisados em microscópio Confocal Leica SP8.

Imunohistoquímica in toto: Os estudos de imunohistoquímica em embriões de zebrafish inteiros serão realizados após fixação durante a noite em PFA 4% ou em fixador Dents (80% metanol: 20%DMSO) a 4°C e posterior armazenamento a -20°C em metanol 100%. Após reidratação em PBS1X, os embriões fixados serão tratados com proteinase K durante 30 minutos, refixados e incubados em tampão de bloqueio (10% FBS e 1% BSA em PBS 1×) durante 2-3 horas, período após o qual serão incubados a 4°C durante a noite com o anticorpo primário. Em seguida os embriões serão incubados com anticorpo secundário por 90 minutos. Para imunohistoquímica em cortes, embriões fixados em PFA 4% serão lavados em PBS, criopreservados em sacarose 30% e incluídos em Tissue-Tek OCT (Sakura). Cortes de 12µm de espessura serão realizados em criostato (Leica) e submetidos a imunohistoquímica para os marcadores descritos acima.

Aquisição de imagem por tomografia com luz síncrotron: os embriões selecionados serão levados à linha de luz IMX do anel síncrotron do LNLS (CNPEM) e medidos com feixe rosa ou monocromático a depender do microscópio escolhido e tamanho do embrião. Inicialmente, serão feitas medidas com objetivas de 5X de magnificação, resultando em resolução de pixel 1,64 μm .

Em estudos preliminares padronizamos medidas com até 1500 projeções distribuídas angularmente de 0° a 180° feitas a partir de feixe policromático de energia entre 5keV e 20keV. Para garantir um melhor poder de penetração do feixe utilizamos filtros de silício de espessura 200 e/ou 350 μm . Após a aquisição das projeções, um volume tridimensional completo pode ser reconstruído utilizando o algoritmo Raft, podendo ser implementado a filtragem de anéis. Finalmente, o bloco binário de imagens será levado aos softwares específicos para segmentação e análise volumétrica (e.g. Avizo/Amira, VG Studio).

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS DO ANEXO

19. Wilkinson, D., *Whole mount in situ hybridization of vertebrate embryos*, in *In Situ Hybridization: A Practical Approach*, I. Press, Editor. 1992: Oxford. p. 75-83.
20. Stern, C.D., *Detection of multiple gene products simultaneously by in situ hybridization and immunohistochemistry in whole mounts of avian embryos*. *Curr Top Dev Biol*, 1998. **36**: p. 223-43.