



Modelos animais para infecção experimental pelo vírus Zika: uma revisão sistemática

Animal models for experimental Zika virus infection: a systematic review

Modelos animales para la infección experimental por el virus del Zika:
una revisión sistemática

Derick Mendes Bandeira¹, Ana Luisa Teixeira de Almeida¹, Gabriela Cardoso Caldas¹,
Debora Ferreira Barreto-Vieira¹.

RESUMO

Objetivo: Investigar na literatura modelos animais utilizados para pesquisa com o vírus Zika em que haja a possibilidade de quantificação de carga viral e análises histopatológicas. **Métodos:** Trata-se de uma revisão sistemática redigida de acordo com as diretrizes do método PRISMA (2020). Os autores realizaram a busca inicial de artigos nas plataformas PubMed, Embase, Google Acadêmico, LILACS e Scielo. **Resultados:** Foram encontrados inicialmente 735 artigos, dos quais 27 foram incluídos após avaliação pelos critérios de inclusão e exclusão. Camundongos e primatas não-humanos foram as espécies mais utilizadas (88,89% dos estudos). A cepa viral mais frequente foi a PRVABC59 (Porto Rico, 2015) e, em 77,78% dos estudos, o vírus foi inoculado por via subcutânea. Entre os sinais clínicos mais reportados estão a conjuntivite/secção ocular, paralisia dos membros inferiores, letargia e postura arqueada. As análises histopatológicas foram feitas principalmente em cérebro e presença de infiltrado inflamatório e degeneração celular foram as alterações mais comuns. **Considerações finais:** Todos os modelos animais analisados apresentaram manifestações clínicas relevantes da infecção pelo vírus Zika. No entanto, a maior parte dos estudos investiga danos cerebrais, não caracterizando os danos histopatológicos em outros órgãos. Além disso, considerando a ampla biodiversidade de espécies, novos modelos animais podem ser investigados.

Palavras-chave: Vírus Zika, Modelos animais, Revisão sistemática.

ABSTRACT

Objective: To investigate in the literature animal models used for research with the Zika virus in which there is the possibility of quantification of viral load and histopathological analysis. **Methods:** This is a systematic review written in accordance with the guidelines of the PRISMA method (2020). The authors performed the initial search for articles on PubMed, Embase, Google Scholar, LILACS, and Scielo. **Result:** Initially, 735 articles were found, 27 of which included after evaluation according to the inclusion and exclusion criteria. Mice and non-human primates were the most used species (88.89% of the studies). The most frequent viral

¹ Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral. Instituto Oswaldo Cruz. Fundação Oswaldo Cruz. Rio de Janeiro - RJ.

strain was PRVABC59 (Porto Rico, 2015), and in 77.78% of the studies, the virus was inoculated subcutaneously. Among the most reported clinical signs are conjunctivitis/ocular discharge, paralysis of the lower limbs, lethargy and hunched posture. Histopathological analyzes were performed mainly in the brain, and the presence of inflammatory infiltrate and cellular degeneration were the most common alterations. **Final considerations:** All animal models analyzed showed relevant clinical manifestations of Zika virus infection. However, most studies investigate brain damage, not characterizing histopathological damage in other organs. Furthermore, considering the wide biodiversity of species, new animal models can be investigated.

Keywords: Zika virus, Animal models, Systematic review.

RESUMEN

Objetivo: Investigar en la literatura modelos animales utilizados para la investigación con el virus Zika con cuantificación de carga viral y análisis histopatológico. **Métodos:** Es una revisión sistemática redactada según el método PRISMA (2020). Los autores realizaron una búsqueda inicial de artículos en PubMed, Embase, Google Académico, LILACS y Scielo. **Resultados:** Inicialmente, se encontraron 735 artículos, 27 de los cuales fueron incluidos después de la evaluación por los criterios de inclusión y exclusión. Los ratones y primates no humanos fueron los más utilizados (88,89%). La cepa viral más frecuente fue PRVABC59 (Puerto Rico, 2015) y, en 77,78% de los estudios, el virus se inoculó por vía subcutánea. Entre las manifestaciones clínicas más reportadas se encontraron conjuntivitis/secreción ocular, parálisis de los miembros inferiores, letargia y postura arqueada. Los análisis histopatológicos se realizaron principalmente en el cerebro y la presencia de infiltrado inflamatorio y degeneración celular fueron las alteraciones más comunes. **Consideraciones finales:** Todos los modelos animales analizados mostraron manifestaciones clínicas relevantes de la infección por el virus del Zika. Sin embargo, la mayoría de los estudios investigan el daño cerebral, no caracterizando cambios histopatológicos en otros órganos. Además, considerando la amplia biodiversidad de especies, se pueden investigar nuevos modelos animales.

Palabras clave: Virus Zika, Modelos animales, Revisión sistemática.

INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus de RNA, fita simples, polaridade positiva, pertencente à família *Flaviviridae* (ICTV, 2023). Este vírus foi isolado em 1947 (DICK GW, et al., 1952), porém durante muitos anos os casos humanos eram raros e predominantemente assintomáticos ou oligossintomáticos. Em 2015, no entanto, a atenção mundial foi despertada durante a epidemia ocorrida no Brasil (MARTÍN-ACEBES MA e SAIZ JC, 2019), quando, pela primeira vez, foi sugerida a correlação da infecção com o desenvolvimento de microcefalia (WEN Z, et al., 2017) e quadros clínicos graves, como a síndrome de Guillain-Barré (MALTA JM, et al., 2017), falência pulmonar, hepática e renal (CARDONA-OSPINA JA, et al., 2019).

Mesmo neste novo cenário, apenas 20 a 25% dos infectados apresentam sintomas, sendo os principais: rash cutâneo, dor de cabeça, febre, dor muscular e conjuntivite (BRASIL, 2016). Em menor grau, alguns pacientes relatam vômito, diarreia, olhos avermelhados, edema, dor abdominal, perda de apetite e hematoespermia (MUSSO et al., 2014). O diagnóstico a partir da clínica muitas vezes não é possível, dada a semelhança com outras arboviroses, como dengue e chikungunya (BELTRÁN-SILVA SL, et al., 2018).

Por ser uma doença estudada mais intensamente há pouco tempo, muitas informações sobre a patogenia do vírus ainda continuam indisponíveis. A descoberta inicial do vírus entre primatas não humanos mostra que este patógeno tem como reservatório animais (DICK GW, et al., 1952), característica que torna sua erradicação mais difícil, porém, por outro lado, permite a utilização de modelos animais para o estudo da infecção.

Neste contexto, este estudo visa apresentar uma revisão sistemática da literatura sobre modelos animais para o estudo da infecção experimental pelo vírus Zika, com ênfase na detecção de viremia (presença do vírus no sangue), carga viral em diferentes órgãos e realização de análises histopatológicas.

MÉTODOS

A revisão sistemática foi realizada de acordo com as diretrizes do método PRISMA (PAGE, 2021). Inicialmente foram realizadas buscas de artigos sobre o tema nas bases de dados PubMed, Embase, Google Acadêmico, Scielo e LILACS. O **Quadro 1** exibe os códigos de busca utilizados em cada uma destas bases de dados.

Quadro 1 - Códigos e/ou mecanismos de busca utilizados em cada base de dados.

BASE DE DADOS	CÓDIGO / MECANISMO DE BUSCA
PubMed	(Zika[Title] OR ZIKV[Title]) AND model[Title/Abstract] AND animal AND infection NOT review
Embase	(zika:ti OR zikv:ti) AND animal:ab, ti AND model:ab, ti NOT review:ab, ti
Google Acadêmico	allintitle: Zika model infection
Scielo	(ti:(zika) OR ti:(zikv)) AND (animals) AND NOT (review)
LILACS	((ti:"Zika") OR (ti:"ZIKV")) AND (ab:"animal")

Fonte: Bandeira DM, et al., 2023.

Após a busca, todas as referências foram exportadas para a plataforma Rayyan e aplicado o recurso de detecção automática de duplicatas. A seguir, foi realizada análise do título dos artigos e eliminados todos os que se enquadravam em algum critério de exclusão ou que não se quadravam em algum critério de inclusão. Os artigos restantes passaram para a análise de resumo e, por fim, de texto completo. Todas estas etapas foram realizadas em formato duplo-cego por dois pesquisadores. Ao final de cada etapa, o duplo-cego foi removido e as discordâncias foram discutidas objetivando elaborar uma decisão consensual.

O **Quadro 2** mostra os critérios de inclusão dos estudos e, o **Quadro 3**, os de exclusão. Estes últimos foram avaliados na ordem hierárquica em que são apresentados e, caso um artigo se enquadrasse em mais de um motivo de exclusão, o critério atribuído seria o que estivesse posicionado mais acima na hierarquia.

Quadro 2 - Critérios de inclusão de estudos na revisão sistemática.

Número	Descrição do critério de inclusão
1	Estudos que envolvam infecção experimental com o vírus Zika.
2	Estudos que realizem detecção do vírus assim como do seu genoma a partir de amostras de sangue e/ou órgãos dos animais inoculados.
3	Estudos que sinalizem as alterações histopatológicas (associados ou não a manifestações clínicas).

Fonte: Bandeira DM, et al., 2023.

Dada a seleção final dos artigos incluídos, foi realizada então a extração dos dados (**Arquivo Suplementar 1**). As variáveis para extração de dados estão listadas no **Quadro 4**. Em seguida, foi realizada a análise do risco de viés a partir da tabela com as informações já extraídas. Para tanto, foi utilizada a ferramenta SYRCLE (HOOIJMANS CR, et al., 2014), que é uma das mais adequadas para revisões sistemáticas de pesquisas experimentais com animais. Ela consiste em 10 perguntas relacionadas a diferentes tipos de vieses (seleção,

performance, detecção, atrito, relato e de outras fontes) para a avaliação de cada um dos artigos incluídos na revisão. Em cada pergunta o risco de viés deve ser classificado como alto, baixo ou incerto. Por fim, os dados foram sumarizados para a escrita do presente artigo, seguindo todas as recomendações do método PRISMA (PAGE MJ, et al., 2021).

Quadro 3 - Hierarquia dos critérios de exclusão da revisão sistemática a serem avaliados.

Posição	Descrição do critério
1°	Estudos descritivos, cartas ao editor, outras revisões sistemáticas, meta-análises, editoriais, comentários e publicações que não exibam por completo a metodologia, resultados e discussão.
2°	Materiais incompletos ou de acesso bloqueado.
3°	Publicações cujo foco principal fossem estudos <i>in vitro</i> ou experimento com humanos.
4°	Artigos fora do tema proposto.
5°	Vias de inoculação viral que não fossem a subcutânea, intravenosa, intraperitoneal ou intramuscular.
6°	Pesquisas nas quais o título do inóculo era superior a 10^6 partículas/mL ou 10^6 TCID ₅₀ /mL ou sem essa informação (TCID ₅₀ : <i>Median Tissue Culture Infectious Dose</i>).
7°	Uso de fármacos em doses duas vezes acima (ou mais) do máximo recomendado para propósitos terapêuticos em humanos.
8°	Estudos que realizaram mais de uma infecção experimental com os mesmos animais em período menor que 15 dias.
9°	Estudos nos quais não havia grupo controle.
10°	Estudos que avaliavam coinfeção experimental com outros patógenos.
11°	Animais com uma lesão pré-existente em algum órgão ou que já tivessem sido utilizados anteriormente para outras pesquisas.
12°	Estudos <i>ex vivo</i> e <i>in silico</i> .
13°	Estudos nos quais houve registro de mortes em grupo controle.

Fonte: Bandeira DM, et al., 2023.

Este protocolo foi submetido à plataforma PROSPERO e, após revisão por pares e ajustes sugeridos pelos avaliadores, foi aprovado com número de registro CRD42021273929. O formulário completo de registro pode ser acessado através do link: https://www.crd.york.ac.uk/prospero/display_record.php?RecordID=273929.

RESULTADOS

A busca inicial nas bases de dados encontrou 735 publicações. Após remoção das duplicatas, análise de título, resumo e texto completo, foram incluídos 27 artigos. A **Figura 1** contém o fluxograma que detalha todas as etapas de seleção.

Entre os artigos incluídos, o órgão mais analisado foi o cérebro (21/27 artigos; 77,78%), seguido por fígado e baço (14/27 artigos cada; 51,85%). Em relação a espécie animal, os camundongos foram os mais utilizados (17/27 artigos; 62,96%), especialmente das linhagens C57BL/6, AG129, A129, BALB/c e Kunming (KM).

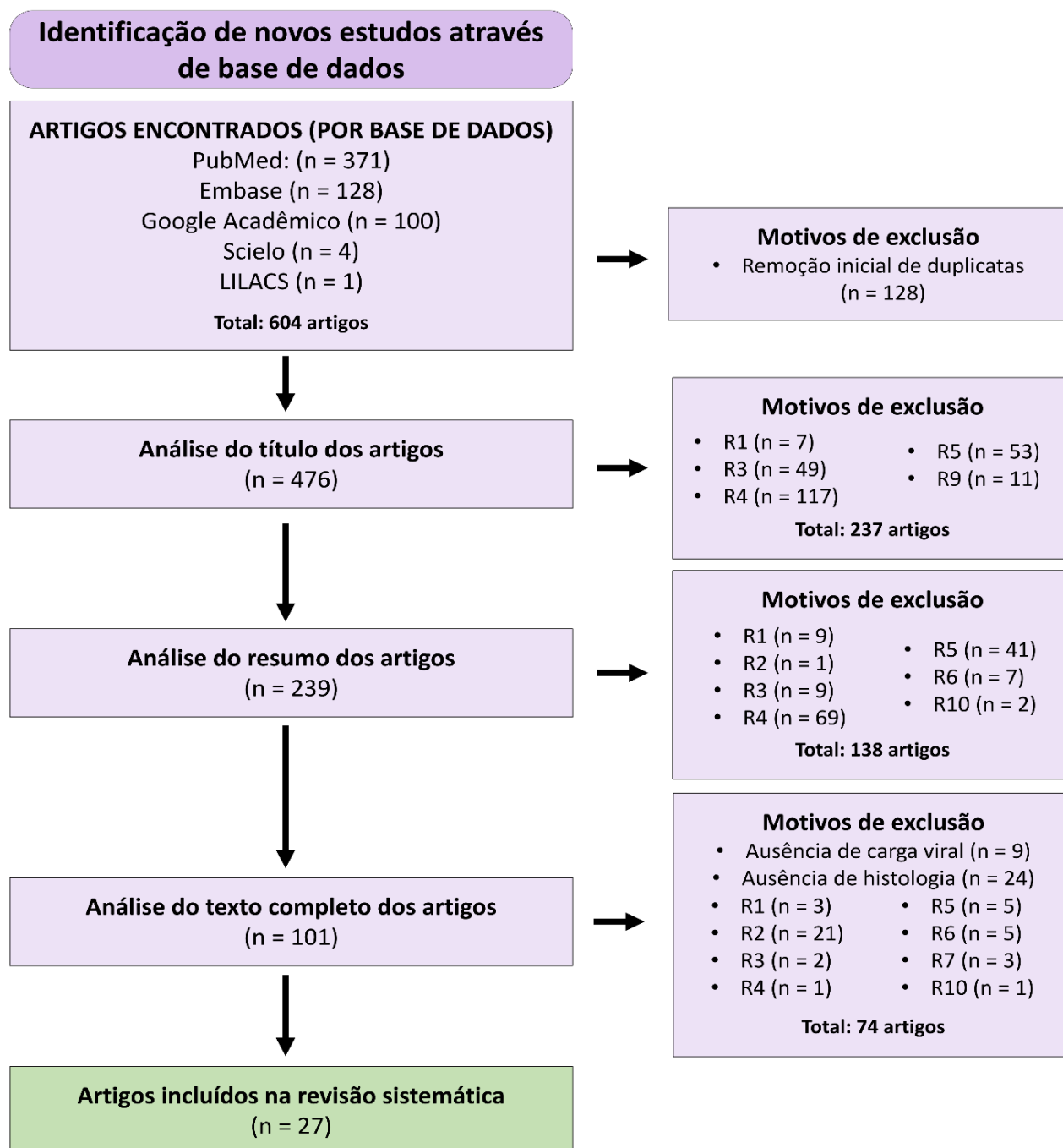
Também foram realizados sete estudos com primatas não humanos (25,92% do total), dos quais cinco eram especificamente com macacos Rhesus (*Macaca mulatta*). Também foram incluídos estudos com marrãs, morcegos frugívoros e o mamífero arborícola *Tupaia belangeri chinensis* (um estudo cada). Em relação ao sexo dos animais, em seis estudos foram usados apenas machos; em cinco, apenas fêmeas; em onze, ambos; e em cinco esse dado não foi informado.

Quadro 4 - Variáveis de interesse para a fase de extração de dados dos artigos incluídos na revisão sistemática.

CATEGORIA DA INFORMAÇÃO	VARIÁVEL
Identificação inicial	*Nome do autor principal
	*Ano de publicação
	*País de realização do estudo
Desenho de estudo	*Grupos de análise
	*Cinética experimental
	*Amostras biológicas processadas
	*Análises realizadas
Caracterização do modelo animal	*Espécie
	*Linhagem
	*Sexo
	*Idade
	*Modificações genéticas
	*Outras informações relevantes
Intervenção realizada	*Origem ou registro da sequência genética do vírus utilizado
	*Dados do preparo do inóculo viral
	*Dose aplicada
	*Via de inoculação
Desfechos primário e secundário	*Carga viral das amostras analisadas
	*Órgãos afetados pela infecção
	*Sinais clínicos compatíveis com a infecção
	*Detecção do vírus por Imuno-histoquímica
	*Tecidos/órgãos onde houve marcação por imuno-histoquímica
	*Alteração de temperatura corporal
Outras informações	*Alteração de peso corporal
	*Limitações do estudo

Fonte: Bandeira DM, et al., 2023.

Figura 1 - Fluxograma com detalhamento das etapas de busca, seleção e inclusão de artigos.



Legenda: R1: artigos que se enquadravam como estudos descritivos, cartas ao editor, revisões sistemáticas, meta-análises, editoriais, comentários ou estudos que a metodologia, resultados e discussão foram apresentados incompletos. R2: Artigos bloqueados ou exibidos parcialmente. R3: Estudos cujo foco principal eram experimentos com cultura de células ou com seres humanos. R4: Estudos fora do tema proposto. R5: Vias de inoculação que não a subcutânea, intramuscular, intravenosa ou intraperitoneal. R6: Título do inóculo maior que 10^6 partículas/mL ou 10^6 TCID₅₀/mL ou sem dados do título. R7: Pesquisas que utilizaram drogas em dose duas vezes maior a máxima recomendada para seres humanos com finalidades terapêuticas. R9: Realização de coinfeção do ZIKV com outros patógenos. R10: Animais com lesão prévia no órgão estudado ou usado previamente para outros estudos. **Fonte:** Bandeira DM, et al., 2023.

As cepas virais mais utilizadas foram PRVABC59 (Porto Rico, 2015), H/PF/2013 (Polinésia Francesa; 2013) e MR766 (Uganda, 1947). Em 21 dos 27 artigos incluídos (77,78%) o vírus foi inoculado por via subcutânea. A via intraperitoneal foi utilizada em 7 trabalhos (25,92%) e as vias intramuscular e intravenosa apareceram na metodologia de apenas um trabalho cada.

Dados referentes a intensidade e período da viremia, assim como os títulos de RNA viral detectados a partir das amostras de órgãos ou tecidos variaram entre os estudos a depender da espécie, linhagem, idade e sexo do animal utilizado, da dose de vírus inoculado e da presença ou não de tratamento prévio com alguma substância. No entanto, de forma geral, os resultados tendem a apontar detecção de títulos mais elevados de RNA do ZIKV no cérebro, baço, testículo/ovários, rim, fígado e coração. Títulos mais elevados também ocorreram em animais imunossuprimidos.

Os sinais clínicos relatados foram bem diversos, sendo os mais frequentes: conjuntivite ou presença de secreção ocular (22,22% dos artigos), paralisia dos membros inferiores (18,52%), letargia e postura arqueada (14,81% ambos). Dois artigos não relataram a avaliação clínica e, em um dos estudos, os animais foram completamente assintomáticos.

Tabela 1 - Análise de risco de viés dos estudos incluídos de acordo com a ferramenta SYRCLE.

Autor/Ano	Viés de seleção			Viés de performance		Viés de detecção		Viés de atrito	Viés de relato	Outras fontes de Viés
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Wu YH, et al. (2018)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Caine EA, et al. (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Peregrine J, et al. (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Darbellay J, et al. (2017)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Zhang NN, et al. (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Hirsch AJ, et al. (2018)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Snyder-Keller A, et al. (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Dowall SD, et al. (2016)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Ireland DDC, et al. (2020)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Snyder-Keller A, et al. (2020)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Malmolov A et al., (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Branche E, et al. (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
de La Veja MA, et al. (2019)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Chiu CY, et al. (2017)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Zmurko J, et al. (2016)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Mavigner M, et al. (2018)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Kawiecki AB, et al. (2017)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Li S, et al. (2018)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Martinot AJ, et al. (2018)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Aliota MT, et al. (2016)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Yu J, et al. (2017)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Miner JJ, et al. (2016)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Panganiban AT, et al. (2020)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Li XF, et al. (2016)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Julander JG, et al. (2017)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	?
Dowall SD, et al. (2016)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B
Zheng B, et al. (2021)	?	?	?	?	?	?	?	A	A	B

Legenda: A (Alto risco de viés); B (Baixo risco de viés); ? (Risco de viés incerto); Critérios avaliados: 1- Sequência de alocação; 2- Características de base; 3- Ocultação de alocação; 4- Alojamento aleatório; 5- Mascaramento; 6- Avaliação aleatória do desfecho; 7- Mascaramento para avaliação dos resultados; 8- Dados incompletos sobre o desfecho; 9- Relato seletivo do desfecho; 10- Outras fontes de viés.

Fonte: Bandeira DM, et al., 2023.

A presença do ZIKV foi confirmada pela técnica de imuno-histoquímica (IHQ) em 16 dos artigos incluídos (59,25%). O cérebro foi o órgão onde a detecção do antígeno-ZIKV específico foi mais comumente verificado por IHQ (12/16 dos estudos que realizaram a técnica; 75%), seguido por testículo (4/16; 25%) e fígado (3/16; 18,75%).

A análise histopatológica teve como principal alteração relatada a presença de infiltrado de células mononucleares (62,96%), seguido por evidência de degeneração de estruturas teciduais (29,62%), presença de calcificações no tecido e hemorragia (ambos com 3/27 artigos; 11,11%). Os órgãos onde mais foram observadas alterações foram o cérebro (16/27 artigos; 59,25%), testículo e epidídimo (7/27; 25,92%), baço (4/27; 14,81%) e fígado (11,11%). De forma menos expressiva também foram relatadas alterações na vasculatura, pele, músculo, olhos, placenta, glândula salivar, rim e coração. Somente um dos estudos não encontrou nenhuma diferença histológica entre animais controle e infectados.

Em relação a alteração da temperatura dos animais, a maior parte dos artigos (23/27; 85,18%) não informou esse dado. Dois estudos relataram hipotermia em animais infectados e um relatou febre em parte dos animais. As alterações de peso também não foram descritas em uma parte considerável dos artigos incluídos (13/27; 48,14%). Em sete estudos, a perda alcançou 20% ou mais do peso inicial dos animais, o que motivou a eutanásia deles.

A maioria dos estudos também não informou as limitações de seus experimentos (21/27; 77,77%). Entre os 6 artigos que o fizeram, os problemas descritos estavam associados ao próprio modelo, ao número de animais disponíveis ou à falta de etapas adicionais da pesquisa que poderiam ter agregado informações relevantes.

Por fim, ao aplicarmos a ferramenta SYRCLE para análise de risco de viés (**Tabela 1**), observamos que a maior parte dos estudos não informa dados importantes do processo metodológico, tornando incerta a avaliação sobre os critérios associados aos vieses de seleção, performance e detecção. Em relação aos vieses de atrito e de relato, o risco foi alto em todos os artigos. Já em relação a outras fontes de vieses, o risco foi incerto em doze estudos e baixo nos demais.

DISCUSSÃO

Primatas não humanos

Devido a semelhança genética com os seres humanos e, por ter sido inicialmente isolado nesses animais (DICK GW, et al., 1952), o uso de primatas não humanos como modelo para o estudo da infecção pelo ZIKV já era esperado. No trabalho de Peregrine J, et al. (2019), realizado com babuínos verde-oliva inoculados com a cepa da Polinésia Francesa, foram observados sintomas brandos da infecção (*rash* e conjuntivite). O vírus foi detectado no sêmen, epidídimo e testículo. Além disso, observou-se processo inflamatório no sistema reprodutor e redução da espermatogênese.

Em relação ao impacto da cepa no desfecho da infecção, em um estudo com Saguis (*Callithrix jacchus*) inoculados com a cepa de Uganda, os animais não apresentaram nenhum sinal clínico relevante (CHIU CY, et al., 2019). Historicamente, essa cepa estava ligada a casos predominantemente assintomáticos ou oligossintomáticos em humanos (SLENCZKA W, 2016).

Já nos estudos de Martinot AJ, et al. (2018) e de Panganiban AT, et al. (2020), ambos realizados com fêmeas grávidas de *Macaca mulatta* infectadas com cepas virais que circularam na grande epidemia brasileira, houve relato de abortos espontâneos causados pela infecção. Em um desses trabalhos, foi realizada análise histopatológica da placenta das fêmeas infectadas, onde se observou trombose arterial, infarto a jusante, tecido placentário necrótico, esclerose vilositária, perda de vasos fetais dentro das vilosidades da placenta, intervilosite, ilhas de trofoblastos intermediários e deciduíte placentária (MARTINOT AJ, et al., 2018).

Hirsch AJ, et al. (2018) encontrou resultados semelhantes ao infectar o mesmo modelo animal com a cepa de Porto Rico. Apesar de não ter ocorrido aborto, constatou-se infarto placentar em grandes áreas,

calcificações nas vilosidades do estroma placentário (devido à morte dos fibroblastos), decidualite, vasculite linfoplasmocitária leucocitoclástica, dano às artérias espirais e estreitamento vascular. Outro ponto importante e frequentemente ressaltado nos estudos com primatas não humanos foram as alterações subclínicas no cérebro. Mavigner M, et al. (2018) e Li XF, et al. (2016) observaram infiltrado inflamatório nesse tecido. Também foi observado que, na medula espinhal torácica anterior se formam focos inflamatórios na substância branca, com evidência de degeneração, com múltiplos axônios dilatados e formação esferoide (MAVIGNER M, et al., 2018).

Camundongos imunodeficientes

Os estudos com modelo murino foram bastante diversos em relação ao sexo, idade, linhagens, alterações imunológicas genéticas, vias de inoculação, doses de inóculo e análises realizadas. Ao analisarmos os trabalhos que utilizaram animais imunodeficientes, é comum observar intensas manifestações clínicas causadas pela infecção e alta letalidade. A infecção de camundongos AG129 resultou em 100% de letalidade, seja causada diretamente pelo vírus ou pela necessidade de eutanásia devido aos critérios de ponto final humanitário (JULANDER JG, et al., 2017; DOWALL SD, et al., 2016). Para camundongos C57BL/6, KM e ICR a taxa de letalidade foi de 75 a 100% (LI S, et al., 2018; DOWALL et al., 2016). Além disso, a quantificação de RNA viral nos tecidos demonstrou altos títulos, chegando à ordem de 10^{11} (DOWALL SD, et al., 2016).

Nem todas as alterações genéticas, no entanto, representaram por si só maior susceptibilidade ao ZIKV. Um estudo realizou infecção experimental em camundongos Rag1^{-/-} (depleção para gene que codifica enzimas ligadas ao rearranjo/recombinação de imunoglobulinas), C57BL/6 CD8^{-/-} (depleção de resposta imune linfocitária) e C57BL/6 TCRβ^{-/-} (depleção da síntese do receptor de linfócitos T). Nesses animais não foi relatada qualquer sintomatologia, eles tiveram poucas alterações histopatológicas e, além disso, só apresentaram alguma evidência da infecção quando tratados previamente com anticorpos anti-Ifnar1 (CAINE EA, et al., 2019).

Ademais, o trabalho de Zmurko J, et al. (2016) foi importante para mostrar que, além da imunossupressão, a dose do inóculo também tem grande impacto no desfecho. Ao testar doses variando de 1×10^1 a 1×10^5 PFU/mL em camundongos AG129, foi visto que os sinais clínicos eram mais frequentes e intensos conforme a dose e a eutanásia também precisava ocorrer mais precocemente. Em outra pesquisa, realizada com a mesma linhagem animal, foi descrito que o desfecho independia de a inoculação ser por via subcutânea ou intraperitoneal, mas que a dose era decisiva para a evolução do quadro clínico. Além disso, mesmo em inóculos com baixas concentrações (da ordem de 1 PFU/mL), os animais imunodeficientes apresentam sinais clínicos severos e precisavam ser eutanasiados (ALIOTA MT, et al., 2016).

Semelhantemente ao que foi observado com os estudos em primatas não humanos, além do *status* imunológico dos camundongos e do título viral, a cepa viral também é fator decisivo no desfecho. Ao testarem 3 diferentes cepas em camundongos A129 e sob infecção com diferentes concentrações, Dowall SD, et al. (2017) relataram que apenas a cepa MP1751 (Uganda, 1962) causou alto *score* clínico nos animais, antecipando a eutanásia.

O sexo dos animais também influenciou nos resultados. No estudo de Snyder-Keller A, et al. (2019) foi observado que as fêmeas infectadas tiveram ganho de peso mais lento que os machos. Em outra pesquisa, no qual foram utilizados camundongos duplo *Knockout* para IRF 3 e 7, também foi observada a mesma diferença entre os sexos (KAWIECKI AB, et al., 2017). No entanto, o papel hormonal na patogênese da infecção pelo ZIKV ainda carece de maior investigação.

Ao analisar os resultados da carga viral, observamos que o título detectado é, em geral, consideravelmente superior ao encontrado nos animais imunocompetentes, detectável em mais órgãos e por mais tempo. Já em relação às análises histopatológicas, o órgão mais estudado foi o cérebro. Nele foi visto que há presença de infiltrado polimorfonuclear, fragmentação nuclear difusa dentro da substância cinzenta e branca (DOWALL SD, et al., 2017; DOWALL SD, et al., 2016), necrose neuronal, malácia e encefalite/encefalomielite (BRANCHE E, et al., 2019; ZMURKO J, et al., 2016; KAWIECKI AB, et al., 2017; ALIOTA MT, et al., 2016; JULANDER JG, et al., 2017).

No baço havia centro germinativos com áreas grandes e mal definidas, compreendendo grandes células mononucleares dentro da polpa branca, com numerosos corpos apoptóticos dispersos, figuras mitóticas, proeminente hematopoiese extramedular na polpa vermelha com numerosas células precursoras, corpos apoptóticos e megacariócitos dispersos, numerosos polimorfonucleares maduros dentro dos seios da polpa vermelha (DOWALL, et al., 2017; DOWALL, et al., 2016) e ativação linfocitária (ZHENG B, et al., 2022). Focos de hematopoiese também foram relatados no fígado (DOWALL SD, et al., 2016).

Apesar de ter sido relativamente frequente o relato de conjuntivite ou secreção ocular, apenas um dos estudos se aprofundou na análise histopatológica desse tecido, sendo constatado infiltrado de células inflamatórias na região posterior dos olhos (MINER JJ, et al., 2016).

No músculo estriado esquelético foi relatada degeneração multifocal das miofibras, necrose com infiltração de células inflamatórias e tentativa de regeneração (ALIOTA MT, et al., 2016). Na musculatura cardíaca foram descritos infiltrados de polimorfonucleares no miocárdio, degeneração de cardiomiócitos, *debris* nucleares, infiltração de células inflamatórias nas válvulas atrioventriculares e tecido conjuntivo ao redor do epicárdio (DOWALL SD, et al., 2017).

Por fim, vários estudos relataram alterações no funcionamento dos órgãos reprodutores. Nos ovários há degeneração folicular e infiltrado inflamatório (CAINE EA, et al., 2019). Nos testículos foi observada atrofia (ausência de espermatogênese), fertilidade reduzida em 44% (DE LA VEGA MA, et al., 2019), infiltração de macrófagos (e às vezes de polimorfonucleares) no tecido intersticial, material homogêneo e eosinofílico (interpretado como fluido proteico) expandindo o interstício de forma variável, necrose dos túbulos seminíferos (DOWALL, et al., 2017), epididimite necrossuprativa e células epiteliais descamadas no lúmen (KAWIECKI AB, et al., 2017; ZHENG B, et al., 2022). Um estudo também relatou que animais infectados tinham redução da dosagem de testosterona e que, caso fossem suplementados com esse hormônio, apresentavam menor mortalidade (ZHENG B, et al., 2022).

Camundongos imunocompetentes

Poucos autores utilizaram modelos murinos imunocompetentes. Uma possível causa é que, nos animais que possuíam sistema imunológico plenamente responsivo, os sinais clínicos eram mais discretos, raros, a detecção de carga viral ocorria em menos órgãos (e em menores títulos) e também eram observadas menos alterações histopatológicas. E como não se pode utilizar um *n* grande de animais (por questões éticas), o risco não encontrar nenhuma diferença significativa em relação aos animais controle pode desmotivar muitos pesquisadores. No entanto, este modelo simula melhor a infecção em seres humanos saudáveis que os animais imunossuprimidos. A detecção do RNA viral em cérebro, fígado, baço e rim de camundongos ICR foi observada quando estes foram inoculados com doses virais que variaram de 10^2 a 10^5 . Estes animais apresentaram manifestações clínicas e a análise histopatológica revelou infiltrado monocitário ao redor de vasos sanguíneos (WU YH, et al., 2018).

No trabalho de Yu J, et al. (2017) realizado com camundongos BALB/c, C57BL/6 e Kunming (KM), o vírus foi detectado nos mesmos órgãos, crescendo-se o testículo. No cérebro foi observada necrose eosinofílica, necrose coagulativa, nódulos de células gliais, "células fantasma", infiltrado neutrofílico e linfocítico. No baço havia congestão dos sinusoides, detecção de hemosiderina no citoplasma dos esplenócitos, desaparecimento das ilhas eritroblásticas, expansão de centros germinativos, hiperplasia linfóide reativa nos folículos linfóides da polpa branca, congestão do sinusóide esplênico na polpa vermelha e numerosas células gigantes multinucleadas. No fígado observou-se degeneração hidrópica, hiperplasia renovável ou morte de hepatócitos, desaparecimento das ilhas eritroblásticas e atrofia dos hepatócitos próximos à região da veia central (congestão crônica). No rim houve edema nas células epiteliais do túbulo renal próximas à cápsula, com hiperemia no mesênquima.

Snyder-Keller A, et al. (2019) também realizaram experimentos com diferentes linhagens de camundongos: C57BL/6J (B6), 129S1/SvImJ (129S1), FVB/NJ (FVB), e DBA/2J (DBA). O RNA viral foi detectado no fígado, baço e rim de todos os animais, porém sempre com títulos virais de 10^4 ou menos. No cérebro, os títulos foram mais altos, chegando a 10^8 , com período de detecção mais prolongado (até 27 dias

pós-infecção) e foi o único órgão onde foram descritas alterações histopatológicas (ativação e apoptose glial, além grandes áreas de calcificação).

Camundongos 129S1 e B6 tiveram perda de balanço e ataxia em 11 dias pós-infecção. Os mais afetados tiveram constantes quedas, convulsões e paralisia dos membros posteriores. Camundongos DBA tiveram poucos sintomas motores e um animal teve convulsões. Resultados semelhantes foram encontrados em estudo do mesmo grupo, realizado no ano seguinte. Nesse segundo experimento, no entanto, também foi encontrada deposição de ferro sobre as áreas de calcificação (SNYDER-KELLER A, et al., 2020).

Outros modelos animais

Ao longo desta revisão sistemática, vários outros modelos animais promissores foram encontrados. No entanto, apenas três continham, simultaneamente, análises de carga viral e histopatológica, além de não se enquadrarem em nenhum dos critérios de exclusão da pesquisa.

No primeiro deles foi realizada inoculação intraperitoneal de marrãs grávidas da linhagem *Landrace-cross* com a cepa de Porto Rico. Nesse estudo, as fêmeas não apresentaram nenhuma sintomatologia relevante, além de discreta perda de peso. E apesar de também não terem sido descritos casos de aborto, os filhotes nasceram com redução do tamanho cerebral e dois deles apresentaram graves alterações neurológicas e de desenvolvimento (DARBELLAY J, et al., 2017).

E apesar de, em seres humanos, essas manifestações também já terem sido relatadas (FREITAS DA, et al., 2020), os autores destacaram importantes diferenças entre marrãs e humanos, como a estrutura placentária, o que poderia dificultar estudos que visem justamente a comparação entre as espécies e inferência dos achados.

O segundo modelo proposto foi a utilização do mamífero arborícola *Tupaia belangeri chinensis*, cuja inoculação se deu pela via subcutânea, com inóculo viral com concentrações de 10^5 a 10^6 PFU (*Plaque Forming Unit*) da cepa GZ01 (ZHANG NN, et al., 2019).

Os animais não ficaram febris, mas apresentaram *rash* cutâneo e petéquias na região abdominal, foram capazes de gerar viremia e o RNA viral foi detectado no cérebro, coração, fígado, baço, pulmão, rim, testículo e músculos. Os testículos foram os locais onde a carga viral atingiu os maiores títulos e, na análise histopatológica desse órgão, também foram observadas importantes alterações estruturais nos túbulos seminíferos. Outra alteração relatada foi a presença de hemorragia e infiltrados inflamatórios na hipoderme.

Por fim, o terceiro modelo foi proposto por Malmlov A, et al. (2019), que inocularam $7,5 \times 10^5$ PFU da cepa de Porto Rico, por via subcutânea, em morcegos frugívoros machos da espécie *Artibeus jamaicensis*. A infecção cursou de forma assintomática nesses animais, porém foram observadas importantes alterações histopatológicas, como inflamação na glândula salivar, degeneração celular e infiltração de linfócitos no testículo. No cérebro, foi constatada a degeneração de neurônios.

CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo com o ZIKV em modelo animal tem se concentrado principalmente em primatas não humanos e camundongos e focando as análises, sobretudo, no cérebro. Apesar dos bons resultados obtidos, deve-se incentivar a busca pela ampliação dos modelos disponíveis, bem como aprofundar os estudos histopatológicos da infecção em outros órgãos.

AGRADECIMENTOS

Agradecemos a toda equipe do Laboratório de Morfologia e Morfogênese Viral pelo apoio na execução do projeto.

REFERÊNCIAS

1. ALIOTA MT, et al. Characterization of Lethal Zika Virus Infection in AG129 Mice. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2016; 10(4): e0004682.
2. BELTRÁN-SILVA SL, et al. Clinical and differential diagnosis: Dengue, chikungunya and Zika. *Revista Médica del Hospital General de México*, 2018; 81(3): 146-153.
3. BRANCHE E, et al. Human Polyclonal Antibodies Prevent Lethal Zika Virus Infection in Mice. *Sci Rep.*, 2019; 9(1): 9857.
4. BRASIL P, et al. Zika virus infection in pregnant women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine*, 2016; 375(24): 2321-2334.
5. CAINE EA, et al. Zika Virus Causes Acute Infection and Inflammation in the Ovary of Mice Without Apparent Defects in Fertility. *J Infect Dis.*, 2019; 220(12): 1904-1914.
6. CARDONA-OSPINA JA, et al. Fatal Zika virus infection in the Americas: A systematic review. *International journal of infectious diseases*, 2019; 88: 49-59.
7. CHIU CY, et al. Experimental Zika Virus Inoculation in a New World Monkey Model Reproduces Key Features of the Human Infection. *Sci Rep.*, 2017; 7(1): 17126.
8. DARBELLAY J, et al. Zika Virus Causes Persistent Infection in Porcine Conceptuses and may Impair Health in Offspring. *EBioMedicine*, 2017; 25: 73-86.
9. DE LA VEGA MA, et al. Zika-Induced Male Infertility in Mice Is Potentially Reversible and Preventable by Deoxyribonucleic Acid Immunization. *J Infect Dis.*, 2019; 219(3): 365-374.
10. DICK GW, et al. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg.*, 1952; 46(5): 509-20.
11. DOWALL SD, et al. A Susceptible Mouse Model for Zika Virus Infection. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2016; 10(5): e0004658.
12. DOWALL SD, et al. Lineage-dependent differences in the disease progression of Zika virus infection in type-I interferon receptor knockout (A129) mice. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2017; 11(7): e0005704.
13. FREITAS DA, et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS One*, 2020; 15(12): e0242367.
14. HIRSCH AJ, et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nat Commun.*, 2018; 9(1): 263.
15. HOOIJMANS CR, et al. SYRCLE's risk of bias tool for animal studies. *BMC Med Res Methodol.*, 2014; 14: 43.
16. ICTV. Genus: Flavivirus. Disponível em: https://ictv.global/taxonomy/taxondetails?taxnode_id=202103123. Acessado em: 4 de abril de 2023.
17. IRELAND DDC, et al. Long-term persistence of infectious Zika virus: Inflammation and behavioral sequela in mice. *PLoS Pathog.*, 2020; 16(12): e1008689.
18. JULANDER JG, et al. Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. *Antiviral Res.*, 2017; 137: 14-22.
19. KAWIECKI AB, et al. Tissue tropisms, infection kinetics, histologic lesions, and antibody response of the MR766 strain of Zika virus in a murine model. *Virology*, 2017; 14(1): 82.
20. LI S, et al. Zika Virus Fatally Infects Wild Type Neonatal Mice and Replicates in Central Nervous System. *Viruses*, 2018; 10(1): 49.
21. LI XF, et al. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine*, 2016; 12: 170-177.
22. MALMLOV A, et al. Experimental Zika virus infection of Jamaican fruit bats (*Artibeus jamaicensis*) and possible entry of virus into brain via activated microglial cells. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2019; 13(2): e0007071.
23. MALTA JM, et al. Guillain-Barré syndrome and other neurological manifestations possibly related to Zika virus infection in municipalities from Bahia, Brazil, 2015. *Epidemiol Serv Saude*, 2017; 26(1): 9-18.
24. MARTINOT AJ, et al. Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell*, 2018; 173(5): 1111-1122.e10.
25. MAVIGNER M, et al. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. *Sci Transl Med.*, 2018; 10(435): eaao6975.

26. MINER JJ, et al. Zika Virus Infection in Mice Causes Panuveitis with Shedding of Virus in Tears. *Cell Rep.*, 2016; 16(12): 3208-3218.
27. MUSSO D, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, 2014; 19(14): 20761.
28. PAGE MJ, et al. The PRISMA 2020 statement: an updated guideline for reporting systematic reviews. *International journal of surgery*, 2021; 88: 105906.
29. PANGANIBAN AT, et al. A Zika virus primary isolate induces neuroinflammation, compromises the blood-brain barrier and upregulates CXCL12 in adult macaques. *Brain Pathol.*, 2020; 30(6): 1017-1027.
30. PEREGRINE J, et al. Zika Virus Infection, Reproductive Organ Targeting, and Semen Transmission in the Male Olive Baboon. *J Virol.*, 2019; 94(1): e01434-19.
31. SCHULTZ V, et al. Oligodendrocytes are susceptible to Zika virus infection in a mouse model of perinatal exposure: Implications for CNS complications. *Glia*, 2021; 69(8): 2023-2036.
32. SLENCZKA W. Zika Virus Disease. *Microbiol Spectr.*, 2016; 4(3).
33. SNYDER-KELLER A, et al. Brain Iron Accumulation and the Formation of Calcifications After Developmental Zika Virus Infection. *J Neuropathol Exp Neurol.*, 2020; 79(7): 767-776.
34. SNYDER-KELLER A, et al. Mouse Strain and Sex-Dependent Differences in Long-term Behavioral Abnormalities and Neuropathologies after Developmental Zika Infection. *J Neurosci.*, 2019; 39(27): 5393-5403.
35. WEN Z, et al. How does Zika virus cause microcephaly? *Genes Dev.*, 2017; 31(9): 849-61.
36. WU YH, et al. ICR suckling mouse model of Zika virus infection for disease modeling and drug validation. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2018;12(10): e0006848.
37. YU J, et al. Effective Suckling C57BL/6, Kunming, and BALB/c Mouse Models with Remarkable Neurological Manifestation for Zika Virus Infection. *Viruses*, 2017; 9(7): 165.
38. ZHANG NN, et al. Zika Virus Infection in *Tupaia belangeri* Causes Dermatological Manifestations and Confers Protection against Secondary Infection. *J Virol.*, 2019; 93(8): e01982-18.
39. ZHENG B, et al. Testosterone protects mice against zika virus infection and suppresses the inflammatory response in the brain. *Iscience*, 2022; 25(11): 105300.
40. ZMURKO J, et al. The Viral Polymerase Inhibitor 7-Deaza-2'-C-Methyladenosine Is a Potent Inhibitor of In Vitro Zika Virus Replication and Delays Disease Progression in a Robust Mouse Infection Model. *PLoS Negl Trop Dis.*, 2016; 10(5): e0004695.