

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERATOGENICO E PREVENTIVO DOS
EFEITOS DO ZIKV DE DOIS COMPOSTOS FARMACOLÓGICOS: UM
ESTUDO EM EMBRIÕES DE GALINHA

MAIKEL ROSA DE OLIVEIRA

PORTO ALEGRE

2023

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE MEDICINA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA: CIÊNCIAS MÉDICAS

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERATOGENICO E PREVENTIVO DOS
EFEITOS DO ZIKV DE DOIS COMPOSTOS FARMACOLÓGICOS: UM
ESTUDO EM EMBRIÕES DE GALINHA

MAIKEL ROSA DE OLIVEIRA

Orientador: Prof. Dr. Lucas Rosa Fraga

Dissertação apresentada como requisito parcial
para obtenção de Mestre em Medicina: Ciências
Médicas, da Universidade Federal do Rio
Grande do Sul, Programa de Pós- Graduação
em Medicina: Ciências Médicas.

PORTO ALEGRE

2023

CIP - Catalogação na Publicação

Rosa de Oliveira, Maikel
AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERATOGÊNICO E PREVENTIVO
DOS EFEITOS DO ZIKV DE DOIS COMPOSTOS FARMACOLÓGICOS:
UM ESTUDO EM EMBRIÕES DE GALINHA / Maikel Rosa de
Oliveira. -- 2023.
45 f.

Orientadora: Lucas Rosa Fraga.

Coorientadora: Paula Rigon da Luz Soster.

Dissertação (Mestrado) -- Universidade Federal do
Rio Grande do Sul, Faculdade de Medicina, Programa de
Pós-Graduação em Medicina: Ciências Médicas, Porto
Alegre, BR-RS, 2023.

1. Síndrome Congênita por ZIKV. 2. Microcefalia. 3.
Embriões de galinha. 4. Modelos animais de SCZ. 5.
Fármacos antivirais. I. Rosa Fraga, Lucas, orient.
II. Rigon da Luz Soster, Paula, coorient. III. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

MAIKEL ROSA DE OLIVEIRA

AVALIAÇÃO DO POTENCIAL TERATOGENICO E PREVENTIVO DOS EFEITOS
DO ZIKV DE DOIS COMPOSTOS FARMACOLÓGICOS: UM ESTUDO EM
EMBRIÕES DE GALINHA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Medicina: Ciências
Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul como requisito parcial para a
obtenção do título de mestre em Ciências Médicas.

Aprovado em: 7 de dezembro de 2022.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dra Iraci da Silva Torres
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra Bibiana Verlindo de Araujo
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Prof. Dra Lavinia Schuler-Faccini
Hospital de Clínicas de Porto Alegre

Prof. Dra Chao Yun Irene Yan
Universidade de São Paulo

Prof. Dr Lucas Rosa Fraga
Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Agradecimentos

Primeiramente ao meu orientador, Dr. Lucas Rosa Fraga, pelo apoio, oportunidade, ensinamentos diários, por não largar minha mão em momento algum e por ser essa pessoa inspiradora.

À Dra. Paula Rigon da Luz Soster, minha chefe, coorientadora, por acreditar em mim, por ser paciente, agregadora, sempre disposta a contribuir.

Sou grato à árvore do amor, meu pai José Roberto, que me inspirou e apoiou mesmo não estando mais entre nós, minha mãe Ana Maria, exemplo de mulher, incansável. Agradeço à minha esposa Daiane Amaral, por me acompanhar nesta jornada, por ser essa pessoa doce, paciente, motivadora e parceira.

À minha colega, amiga, dupla, Chris Krebs Danilevicz, por todos esses anos de ensinamentos, ajuda, paciência e amizade.

Ao Instituto Karolliska, pela oportunidade e confiança em poder contribuir com este projeto.

Ao LabChicken, pelos ensinamentos e pelas trocas semanais de conhecimentos, em especial à Karina Wermann e Bianca Suzin, parceiras na minha jornada, por muitos momentos foram meus braços e meus olhos.

Aos professores do LABVIR, que me acolheram, disponibilizaram os espaços e estruturas físicas.

Ao Departamento de Ciências Morfológicas, ICBS (UFRGS), e seus professores, por me proporcionar um ambiente acolhedor e de trocas, imprescindíveis para desenvolver minhas atividades, possibilitando minha qualificação.

Aos professores do Programa de Pós-graduação em Ciências Médicas da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, pelo conhecimento e ensinamentos ofertados.

SUMÁRIO

RESUMO.....	5
ABSTRACT	7
1. INTRODUÇÃO	12
2. REVISÃO DA LITERATURA	14
2.1. Estratégias para localizar e selecionar informações	14
2.2. Vírus zika: histórico e síndrome congênita.....	15
2.3. Teratologia e teratologia experimental	19
2.4. Modelos experimentais para SCZ	22
2.5. O embrião de galinha	24
2.6. Estudos com fármacos e ZIKV	25
3. MARCO CONCEITUAL	29
4. JUSTIFICATIVA	30
5. OBJETIVOS	31
5.1. Objetivos gerais	31
5.2. Objetivos Específicos	31
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	32
7. ARTIGO.....	42
8. CONSIDERAÇÕES FINAIS	43
9. PERSPECTIVAS FUTURAS	45

RESUMO

O Zika Vírus (ZIKV) é um teratígeno humano responsável pela síndrome congênita do ZIKV (SCZ), promovendo microcefalia em recém-nascidos expostos ao vírus durante a gravidez. Até o momento, não existe nenhum fármaco ou vacina que seja utilizado para prevenir ou minimizar os efeitos nocivos causados pelo ZIKV no desenvolvimento embrionário humano. Desta maneira, a avaliação de fármacos conhecidos ou o desenvolvimento de novas moléculas seguras e com efeitos antivirais se reveste de fundamental importância. Neste contexto, dois compostos farmacológicos, TH5487 e TH6744 foram recentemente desenvolvidos e se mostraram antivirais em culturas celulares. Porém, para a continuidade do desenvolvimento destas moléculas, testes em modelo animal são necessários. Os embriões de galinha são um modelo experimental de fácil manipulação e acesso, sendo utilizados em diversos estudos de segurança e eficácia de fármacos. Além disso, há modelos de SCZ em embriões de galinha, o que permite a avaliação da segurança e da eficácia de fármacos antivirais. Assim, o objetivo deste estudo foi avaliar, *in vivo*, a segurança e o potencial antiviral dos compostos TH5487 e TH6744 utilizando embriões de galinha como modelo experimental. Para isso, duas etapas de experimentos foram realizadas conforme descrito a seguir. Na primeira etapa avaliou-se o potencial teratogênico de ambos os compostos, utilizando diferentes concentrações (10 μ M, 20 μ M e 40 μ M) de cada fármaco, aplicadas em embriões de galinha no estágio HH 16-18. Os embriões foram acompanhados por sete dias e ao final foram comparados aos controles em diferentes desfechos: mortalidade, crescimento e taxa de anomalias congênitas. Na segunda etapa, foi verificado o potencial dos compostos na dose mais alta testada (40 μ M) em reduzir ou resgatar as anomalias de desenvolvimento causadas pela exposição embrionária ao ZIKV. Embriões de galinha no estágio HH 10–12 foram expostos ao ZIKV ou ao meio de cultura (controles) e após 24 horas pós-infecção (hpi) ou 72hpi foram expostos ao fármaco ou ao veículo apenas (controles). Os embriões foram avaliados após 96hpi e comparados quanto ao tamanho do mesencéfalo. Como resultados, foi possível observar que ambos compostos não afetaram a sobrevivência, o desenvolvimento e o crescimento dos embriões de galinha,

mostrando-se não teratogênicos nesta espécie animal. Além disso, observou-se que ambos foram capazes de reduzir os efeitos danosos que o ZIKV causou no desenvolvimento encefálico dos embriões testados. Verificou-se que embriões tratados com TH5487 apresentam tamanho encefálico semelhante a controles quando o composto foi aplicado em 24hpi ou 72hpi e que embriões expostos a TH6744 apresentaram tal fenótipo apenas quando o fármaco foi aplicado em 24hpi, demonstrando um efeito tempo-dependente. Concluindo, os dois compostos investigados não se mostraram teratogênicos, apresentaram potencial antiviral, minimizando os efeitos causados pelo ZIKV e recuperando o tamanho médio do mesencéfalo.

Palavras-chave: síndrome congênita por ZIKV, microcefalia, embriões de galinha, ZIKV, modelos animais de SCZ, fármacos antivirais.

ABSTRACT

Zika Virus (ZIKV) is a human teratogen responsible for the Congenital ZIKV Syndrome (CZS), marked by the occurrence of microcephaly in newborns exposed to the during pregnancy. To date, there is no medication or vaccine used to prevent or minimize the harmful effects caused by ZIKV on human embryonic development. Therefore, it is important to evaluate known drugs or develop new safe molecules with antiviral effects. In this context, two pharmacological compounds, TH5487 and TH6744, were recently developed and proved to be antiviral in cell cultures. However, for the continued development of these molecules, tests on animal models are necessary. Chicken embryos are an experimental model that is easy to manipulate and access and have been used in several studies on drug safety and efficacy. Furthermore, there are SCZ models in chicken embryos, which allow the evaluation of the safety and efficacy of antiviral drugs. Thus, the objective of this study was to evaluate *in vivo* the safety and antiviral potential of compounds TH5487 and TH6744 using chicken embryos as experimental model. For this, two steps were carried out, First, the teratogenic potential of these compounds was evaluated. In this evaluation, different concentrations (10 μ M, 20 μ M and 40 μ M) of each compound were applied in chicken embryos at the HH 16-18 stage. The embryos were monitored for seven days and at the end were compared to controls in different outcomes: mortality, growth and rate of congenital anomalies. Next, the potential of the compounds to reduce or rescue developmental anomalies caused by embryonic exposure to ZIKV was evaluate dat the highest tested dose (40 μ M). Chicken embryos at stage HH 10–12 were exposed to ZIKV or culture medium (controls) and after 24 hours post-infection (hpi) or 72 hpi were exposed to the drug or vehicle alone (controls). Embryos were evaluated after 96 hpi and compared for mesencephalon area. As results, it was possible to observe that both compounds did not affect the survival, development and growth of chicken embryos, showing to be non-teratogenic in this animal species.

Furthermore, it was observed that both were able to reduce the harmful effects that ZIKV causes on the brain development of the embryos tested. It was found that embryos treated with TH5487 had brain size similar to controls when the

compound was applied at 24 hpi or 72 hpi and that embryos exposed to TH6744 showed this phenotype only when the drug was applied at 24 hpi, demonstrating a time-dependent effect. In conclusion, both compounds investigated were not teratogenic, had antiviral potential, minimized the effects caused by ZIKV and were capable of recovering the average size of the mesencephalon.

Keywords: congenital ZIKV syndrome, microcephaly, chicken embryos, ZIKV, animal models of CZS, antiviral drugs.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa histórico da distribuição global do ZIKV.

Figura 2 - Distribuição anual dos casos suspeitos de SCZ notificados no Brasil entre 2015 e 2022.

Figura 3 - Marco conceitual.

LISTA DE TABELAS

Quadro 1- Estratégia de busca aplicada para a realização de revisão sistematizada da literatura e busca por artigos relacionados aos temas desta dissertação.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

DMSO	Dimetilsulfóxido
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
hpi	Horas pós-infecção
RdRp	RNA polimerase-RNA dependente
RNA	Ácido ribonucleico
SCZ	Síndrome Congênita do Zika Vírus
SINASC	Sistema Brasileiro de Informação sobre Nascidos Vivos
SNC	Sistema Nervoso Central
SINASC	Sistema de Informação sobre Nascidos Vivos
ZIKV	Zika Vírus

1. INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) foi descoberto em 1947 na floresta Zika, em Uganda e seus primeiros registros de infecção em humanos foram em 1954, na Nigéria (MACNAMARA, 1954). Os primeiros casos de surtos da infecção deste vírus ocorreram em 2007 no Gabão, na África e nas Ilhas Yap e Guão, na Micronésia (WEAVER *et al.*, 2016). Um estudo molecular evolutivo aponta para a chegada do ZIKV no Brasil ainda em 2013, porém sua detecção ocorreu apenas no início de 2015 (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015; FARIA *et al.*, 2016). Neste mesmo ano, observou-se no Brasil um aumento expressivo no número de recém-nascidos com microcefalia nas regiões Norte e Nordeste, onde ocorria a maior circulação do vírus. Em seguida, após avaliação e caracterização criteriosa dos casos foi estabelecida a correlação da exposição do vírus durante a gestação e a microcefalia, passando a ser reconhecido o ZIKV como um novo agente teratogênico (agente ambiental capaz de causar anomalias congênitas) humano, causador da Síndrome Congênita do ZIKV (FARIA *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2016).

A SCZ é caracterizada por um conjunto de anomalias congênitas, estruturais e funcionais, levando a alterações no desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) com diferentes apresentações fenotípicas, incluindo uma série de anomalias cerebrais, deficiência intelectual, dificuldades de coordenação motora e rigidez muscular (DEL CAMPO *et al.*, 2017a; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2022). Entre 2015 e 2022, foram notificados ao Ministério da Saúde do Brasil, mais de 20.000 casos suspeitos de SCZ, dos quais 1.857 casos foram confirmados (BRASIL, 2023). Embora o período de emergência em Saúde Pública tenha sido encerrado oficialmente em 2017, ainda há registros de novos casos e mortes relacionadas à SCZ no Brasil, continuando a ser considerada um problema de saúde global (BRASIL, 2023).

Não é possível descartar a possibilidade de uma nova epidemia de ZIKV em regiões já afetadas e o risco de propagação para outras regiões onde seus vetores, principalmente as espécies de mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, estejam presentes. Uma situação preocupante tendo em conta os efeitos do ZIKV no desenvolvimento neurológico.

Até o momento, não existem vacinas ou fármacos disponíveis que tenham evidências comprovadas de que sejam capazes de prevenir ou minimizar os efeitos danosos que o ZIKV causa no desenvolvimento humano (PIELNAA *et al.*, 2020a). Portanto, a busca por um fármaco anti-ZIKV seguro e eficaz é fundamental, principalmente para uso em gestantes. Neste sentido, alguns medicamentos se destacam em testes como antivirais. O Sofosbuvir, apresentou capacidade de inibição da infecção por ZIKV *in vitro* e *in vivo* (SACRAMENTO *et al.*, 2017).

A niclosamida, não apresentou efeitos teratogênicos em modelos animais e em estudos *in ovo* apresentou propriedades anti-ZIKV (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; CAIRNS *et al.*, 2018; MESCI *et al.*, 2018; SACRAMENTO *et al.*, 2017). Desta forma, ainda se faz necessário o desenvolvimento de novas moléculas que possam atuar como um anti-ZIKV. Dois compostos farmacológicos recentemente desenvolvidos, TH5487 e TH6744, apresentaram propriedades antivirais contra o ZIKV em modelos celulares, demonstrando uma janela terapêutica em um modelo organoide tridimensional (3D) (PETTKE *et al.*, 2020). Garantir a segurança, bem como a capacidade antiviral desses compostos recentemente desenvolvidos são essenciais para a utilização futura em testes clínicos, e, para isso testes *in vivo* são imprescindíveis. Destaca-se aqui o modelo de embrião de galinha, amplamente utilizado e bem estabelecido no estudo de teratologia experimental e testes de triagem de drogas (WACHHOLZ *et al.*, 2021b). Além de inúmeras vantagens, os embriões de galinha são naturalmente suscetíveis ao ZIKV e apresentam fenótipos análogos aos da SCZ humana (GOODFELLOW *et al.*, 2016; THAWANI *et al.*, 2018, 2020; WACHHOLZ *et al.*, 2021a; WILLARD *et al.*, 2017). No sentido de buscar novas moléculas capazes de proteger o embrião em desenvolvimento dos efeitos danosos do ZIKV, se faz necessário a utilização de um modelo animal amplamente utilizado em testes de toxicologia reprodutiva e capaz de mimetizar o fenótipo da SCZ, para a avaliação do potencial teratogênico e antiviral dos compostos TH5487 e TH6744.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Estratégias para localizar e selecionar informações

Uma revisão sistematizada da literatura foi realizada para buscar artigos relacionados aos temas abordados nesta dissertação. A estratégia de busca abrangeu as bases de dados do PubMed e Embase com estudos dos últimos 5 anos. Foram realizadas buscas a partir de combinações de diferentes termos (Quadro1). A partir das buscas realizadas, foram encontrados 304 estudos. Após a remoção de duplicatas (n = 39), foi realizada a leitura de títulos/abstracts, quando foram excluídos 148 artigos por não se encaixarem no objeto de pesquisa. Foram incluídos, desta maneira, 117 artigos. Além disso, outros estudos foram incluídos por conveniência através da busca por termos livres no PubMed ou através da busca por referências contidas em artigos de revisão relacionados ao tema desta dissertação.

Quadro 1: Estratégia de busca aplicada para a realização de revisão sistematizada da literatura e busca por artigos relacionados aos temas desta dissertação.

Tema	Termos de Busca	Artigos Encontrados PubMed	Artigos Encontrados EMBASE
Modelos animais de SCZ	Teratology AND 'Animal model' AND 'Zika virus'	2	4
Modelos Animais e Desenvolvimento de Fármacos Antivirais	'Animal model' AND 'Zika virus' AND 'Antiviral drugs'	62	13
Triagem de Fármacos Antivirais	Malformation OR Teratogenesis AND 'Animal model' AND 'Antiviral drugs'	86	1
Embrião de galinha como modelo para SCZ	'Chicken Embryo' AND 'Zika Virus'	8	6
Embriões de galinha e <i>screening</i> de fármacos	'Drug Screening' AND 'Chicken Embryo'	75	8
Modelos animais para SCZ	'Animal model' AND 'Zika virus' AND 'Malformation'	71	35

2.2. Vírus zika: histórico e síndrome congênita

O vírus Zika (ZIKV) é um vírus de RNA envelopado de fita simples, transmitido principalmente por meio da picada do mosquito *Aedes aegypti*, que pertence à família Flaviviridae (ABRAMS; SOLIS; NATH, 2017; NYARUABA *et al.*, 2019; PIELNAA *et al.*, 2020b). Além do *Aedes aegypti*, outras espécies de mosquitos podem transmitir o vírus, incluindo o vetor da malária, *Anopheles gambiae*, *Mansonia uniformis* e por espécie de mosquitos do gênero *Eretmapodites* (HADDOW *et al.*, 2012). O vírus possui grande transmissibilidade, pois, além da picada do mosquito, também pode ser transmitido por meio de relações sexuais e transmissão vertical, ou seja, da mãe para o bebê durante a gravidez (COELHO, 2012; PIELNAA *et al.*, 2020a; PLOURDE; BLOCH, 2016; SONG *et al.*, 2017).

O ZIKV foi identificado na África, especificamente na floresta Zika, Uganda, e em 1954, houve os primeiros casos de infecção em humanos, na Nigéria (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; MACNAMARA, 1954; MEDIN; ROTHMAN, 2017; SMITHBURN; HADDOW, 1951; WEAVER *et al.*, 2016). Os primeiros casos de surtos da infecção deste vírus ocorreram em 2007 com casos observados no Gabão, na África e nas Ilhas Yap e Guão, na Micronésia (WEAVER *et al.*, 2016). O segundo surto do vírus foi observado em 2013, na Polinésia Francesa e outras ilhas da Oceania (MUSSO *et al.*, 2014). No início de 2015 alguns casos de infecção foram notificados no nordeste do Brasil. Estes números aumentaram e as infecções foram confirmadas em maio do mesmo ano (Figura 1) (FARIA *et al.*, 2016; WEAVER *et al.*, 2016; ZANLUCA *et al.*, 2015). A dispersão do ZIKV no Brasil está relacionada principalmente com a distribuição espacial de seus vetores (MARCONDES; XIMENES, 2015). *A. aegypti* está disperso especialmente nas regiões norte, nordeste e centro-leste do Brasil, já o *A. albopictus* é encontrado em regiões subtropicais da região Sul do país (CARVALHO; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA; BRAGA, 2014; COELHO, 2012; VEGA-RÚA *et al.*, 2014).

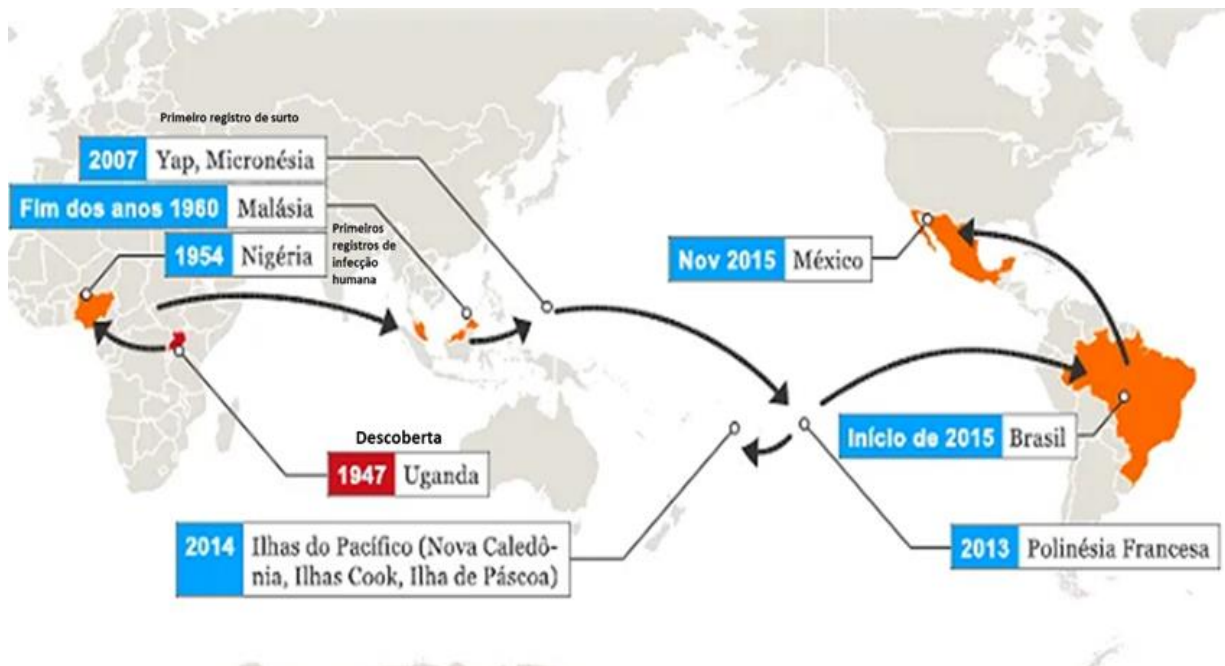


Figura 1: Mapa histórico da distribuição global do ZIKV. Adaptado de Deutsche Welle, 2016. Universidade de Lancaster, Journal of General Virology.

Salvas as exceções, por se tratar de um vírus de baixo efeito na saúde humana, sua passagem pela América do Sul não teria tamanha repercussão se não houvessem sido relatados efeitos danosos ao desenvolvimento humano, que começaram a ser observados no final de 2015 (DUFFY *et al.*, 2009; IOOS *et al.*, 2014; PLOURDE; BLOCH, 2016). Em outubro deste ano, a Secretaria Estadual de Saúde de Pernambuco notificou o Ministério da Saúde sobre as investigações iniciais de 26 casos de microcefalia, recebidos de diversos serviços de saúde nas semanas anteriores à notificação. Tais casos diferiram do habitual e se concluiu que se tratava de evento de importância para a saúde pública estadual (BRASIL, 2023). De acordo com o Sistema Brasileiro de Informação sobre Nascidos Vivos (SINASC), entre 2000 e 2014 a prevalência de microcefalia, antes da circulação do ZIKV, era de 5,5 por 100 mil nascidos vivos (MARINHO *et al.*, 2016). Em 2015, observou-se um aumento expressivo nos casos de microcefalia (Figura 2) com uma prevalência de 54,6 por 100 mil nascidos vivos, ou seja, um aumento de 9,8 vezes (MARINHO *et al.*, 2016; MARRS *et al.*, 2016). A partir de uma caracterização clínica minuciosa e a avaliação dos casos de microcefalia relacionados à infecção pelo ZIKV, foi

estabelecida então, a correlação da exposição ao vírus durante a gestação e a microcefalia e o ZIKV passou a ser considerado um teratogêno humano, o causador da Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) (RASMUSSEN *et al.*, 2016; SCHULER-FACCINI, Lavinia *et al.*, 2016; SCHULER-FACCINI, L. *et al.*, 2016a).

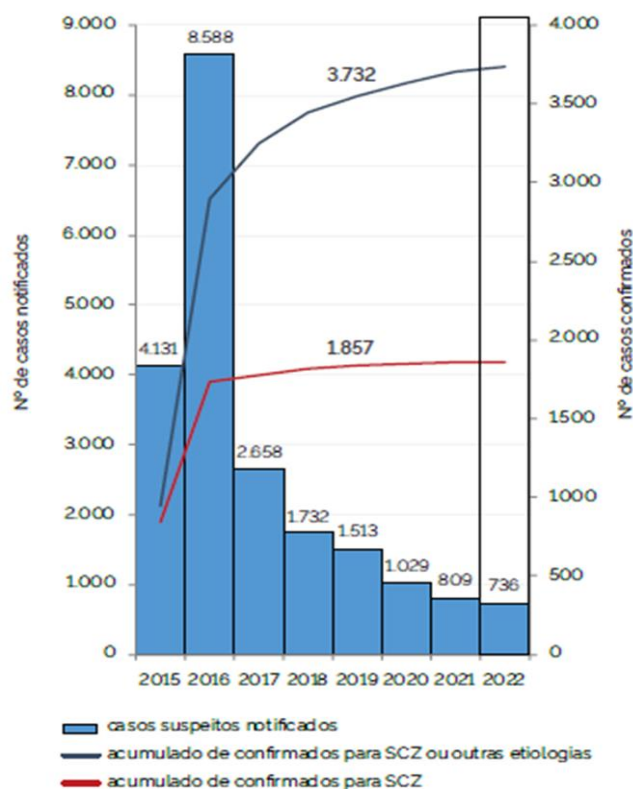


Figura 2: Distribuição anual dos casos suspeitos de SCZ notificados no Brasil entre 2015 e 2022. A partir de 2015, os casos de ZIKV passaram a ser de notificação compulsória. Fonte: Ministério da Saúde, Boletim epidemiológico 5/2023.

A SCZ se caracteriza por um conjunto de anomalias observadas na criança exposta intraútero ao ZIKV. Dentre as alterações que podem ocorrer em menor ou maior grau, a microcefalia e os problemas de desenvolvimento do sistema nervoso central (SNC) se destacam devido a sua gravidade e alta prevalência nos recém-nascidos (CALVET *et al.*, 2016; DE ARAÚJO *et al.*, 2016; DEL CAMPO *et al.*, 2017a; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2022). As crianças com microcefalia podem apresentar deficiência intelectual, dificuldades na coordenação motora, no balanço postural e na linguagem e, em casos mais graves, também podem apresentar convulsões, epilepsia e rigidez muscular

(ARAGAO *et al.*, 2017; DEL CAMPO *et al.*, 2017a; MOORE *et al.*, 2017; POLONIO *et al.*, 2017; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2022).

Estudos realizados com exames de imagem demonstram que crianças afetadas pela SCZ podem apresentar perda do volume do parênquima cerebral, anomalias na formação dos sulcos e giros cerebrais, agenesia do corpo caloso e ventriculomegalia. Os exames também demonstram lisencefalia, uma acentuada ausência de sulcos e giros cerebrais, e calcificações cerebrais, fatores que limitam seu desenvolvimento e crescimento, comprometendo suas funções (FRANÇA *et al.*, 2016; POLONIO *et al.*, 2017; RIBEIRO *et al.*, 2017; SCHULER-FACCINI *et al.*, 2022; SOARES DE OLIVEIRA-SZEJNFELD *et al.*, 2016). A exposição ao vírus durante a gravidez pode levar ao nascimento de crianças sem qualquer manifestação de microcefalia, porém no decorrer do desenvolvimento pós-natal, estas passam a apresentar crescimento lento da cabeça, incompatível com o crescimento do restante do corpo (LINDEN, 2016). Desfechos diversos têm sido reportados evidenciando maior ou menor grau de alterações e comprometimentos, bem como ausência de qualquer alteração (DEL CAMPO *et al.*, 2017a; FRANÇA *et al.*, 2016).

Nos últimos anos os casos suspeitos de infecção por ZIKV reduziram drasticamente no Brasil, estando no menor patamar, com 736 casos notificados (BRASIL, 2023). Entretanto, a circulação do ZIKV no país, o estabelecimento de seus vetores em regiões tropicais e subtropicais com condições climáticas e ambientais adequadas, alterações climáticas mundiais, como o aquecimento global, crescimento populacional, urbanização rápida e não planejada e falta de saneamento básico formam uma combinação perfeita para a proliferação do vetor. Tais alterações poderão implicar no surgimento de novos surtos de ZIKV em regiões que antes não foram acometidas pelo vírus (BROWN *et al.*, 2014; LIU *et al.*, 2020; MENDONÇA; SOUZA; DUTRA, 2009). Até o presente momento não existem vacinas ou fármacos com evidência comprovada de que sejam capazes de prevenir ou tratar os efeitos danosos que o ZIKV causa no desenvolvimento embrionário em humanos (BERNATCHEZ *et al.*, 2020). Sendo assim, é necessário compreender os mecanismos relacionados à patogênese do vírus e o desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes.

2.3. Teratologia e teratologia experimental

A teratologia (ou teratogênese) estuda as anomalias congênitas ocorridas a partir da exposição do embrião e/ou feto a um agente externo ao seu desenvolvimento. Este agente é chamado de teratogênico e pode ser químico, físico, biológico ou uma condição materna (DICKE, 1989; FRAGA; DIAMOND; VARGESSON, 2016; FRAGA *et al.*, 2022; WACHHOLZ *et al.*, 2021b). A teratologia, estuda as anomalias congênitas causadas por agentes teratogênicos em diferentes frentes, tendo um olhar amplo, busca realizar a descrição morfológica afetadas por estes agentes, a identificação das funções alteradas, a identificação de possíveis mecanismos envolvidos e como os agentes teratogênicos influenciaram durante as diferentes etapas do desenvolvimento embrionário, os padrões, a incidência, as associações e correlações de diferentes anomalias (CALADO; DOS ANJOS PIRES, 2018; DESESSO, 2019; FINNELL, 1999).

O termo teratologia foi utilizado pela primeira vez no século XIX, sendo inicialmente empregado como uma ciência descritiva das anomalias congênitas (CALADO; DOS ANJOS PIRES, 2018; SMITHELLS; NEWMAN, 1992; UJHÁZY *et al.*, 2012). Um evento importante no estudo da teratogênese, mais precisamente para teratogênese experimental, foi a observação de que condições nutricionais maternas influenciam o desenvolvimento embrionário. Um estudo conduzido por Hale (1935) relatou que a exposição de porcas grávidas a uma dieta deficiente de vitamina A resultou no nascimento de filhotes com anomalias oculares. Ainda na década de 1940, a partir da epidemia de rubéola e sua relação com anomalias oculares em recém-nascidos, ficou evidente que agentes externos podem atravessar a barreira hemato placentária e causar danos aos embriões/fetos (GREGG, 1991; WARKANY; NELSON, 1940). Tais descobertas contribuíram para que a teratologia seja, hoje, a ciência responsável por estudar as causas e os mecanismos envolvidos nas anomalias congênitas induzidas por agentes externos.

Ainda, a evolução da teratologia de uma ciência descritiva para uma ciência moderna, só foi possível a partir do desenvolvimento de ensaios pré-clínicos, utilizando modelos animais. A tragédia da talidomida, na década de

1960, foi responsável pela ampliação do conhecimento sobre teratologia, trazendo uma grande importância para o campo da teratologia experimental. A partir da experiência com a talidomida, a percepção referente à segurança do embrião/feto mudou drasticamente, quando se tornou conhecido do grande público os efeitos de um aparentemente inofensivo sedativo, usado para evitar enjoos matinais (ANDERSON, 2001; COOPER, 2004; VARGESSON; STEPHENS, 2021). Foi observado que a exposição da talidomida durante o período pré-natal induziu uma série de malformações congênitas, que em conjunto caracterizam a Embriopatia da Talidomida. As anomalias congênitas podem atingir a vários tecidos e órgãos, incluindo membros, olhos, orelha, genitais e sistema cardiovascular (FRAGA; DIAMOND; VARGESSON, 2016; SMITHELLS; NEWMAN, 1992; TAJIMA *et al.*, 2016; VARGESSON, 2019; VARGESSON *et al.*, 2023). A partir do evento da talidomida, foram criados ao redor do mundo sistemas de vigilância em anomalias congênitas e de informação sobre agentes teratogênicos (OLIVEIRA; BERMUDEZ; SOUZA, 1999).

Um dos principais conhecimentos proporcionados com a tragédia da talidomida foi de que nem todas as espécies são naturalmente e igualmente suscetíveis aos efeitos teratogênicos de um dado agente. Observou-se que, no caso da talidomida, os roedores são menos sensíveis aos efeitos teratogênicos deste fármaco (JANER *et al.*, 2008; VARGESSON, 2015). Devido a este entendimento da variabilidade interespecífica dos teratógenos, a partir da década de 1960, para todos os estudos pré-clínicos para avaliação de toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento é obrigatório o uso de múltiplas espécies animais (VARGESSON, 2013).

A teratologia experimental da busca a compreensão e a definição de risco previamente observado, a avaliação de potenciais riscos ainda desconhecidos, incluindo a avaliação do potencial teratogênico de fármacos, e a definição dos mecanismos envolvidos nos efeitos teratogênicos de um determinado agente (VARGESSON; FRAGA, 2017). A utilização de modelos animais tem um papel de destaque na teratologia, pois permitem a investigação dos efeitos de agentes teratogênicos no desenvolvimento embrionário. Além disto, estes modelos, fornecem, auxiliam na obtenção de um maior conhecimento da etiologia das anomalias congênitas, tornando possível a reprodução controlada de condições

experimentais e a observação dos resultados. Portanto, esses modelos são primordiais para a avaliação de riscos de teratógenos e conseqüentemente translação para a promoção da saúde em humanos. (SADLER, 2019, 2022; VARGESSON; FRAGA, 2017).

Diferentes modelos animais têm sido utilizados para esse fim, cada modelo com sua especificidade, objetivando diferentes aspectos da teratologia. Destacam-se como modelos animais mais amplamente os camundongos, embriões de galinha, *zebrafish* e primatas não humanos. A escolha pelo modelo animal experimental depende de diversos fatores, que incluem a similaridade de fenótipos após exposição ao agente teratogênico, facilidade de manuseio, limitações éticas e financeiras, tempo de desenvolvimento embrionário, acessibilidade aos órgãos avaliados, princípio de espécie-especificidade, susceptibilidade ao teratógeno, entre outros. Os modelos de embrião de galinha e de *zebrafish* são vantajosos comparados a modelos com placenta, pois eliminam os fatores de confusão, como o metabolismo materno (CASSINA *et al.*, 2012).

Desta forma, modelos de experimentação animal possibilitam estudos pré-clínicos de toxicidade do desenvolvimento, avaliação do seu risco à exposição e conseqüentemente avaliação de mecanismos de teratogênese (CUGOLA *et al.*, 2016; EMA *et al.*, 2010; MAHONY *et al.*, 2013). Os dados obtidos a partir de modelos experimentais podem ser extrapolados e comparados com as observações realizadas em seres humanos, permitindo a elucidação e prevenção aos efeitos dos agentes teratogênicos. O uso destes modelos experimentais permite realizar testes com diferentes compostos ou fármacos de forma a controlar fatores como a dose utilizada e o período de exposição. Ademais, a comprovação dos efeitos teratogênicos de um agente ou composto em modelos experimentais é um dos critérios utilizados para classificação do mesmo como teratogênico (SHEPARD, 1994).

2.4. Modelos experimentais para SCZ

Modelos experimentais *in vitro* e *in vivo* vêm sendo utilizados para elucidar os mecanismos de teratogênese do ZIKV. Estes modelos são essenciais para entender os mecanismos de ação do vírus responsáveis pela indução de alterações do desenvolvimento no SNC e demais fenótipos relacionados a SCZ (KAMIYAMA *et al.*, 2017; PENA *et al.*, 2018). Experimentos em culturas celulares e organoides cerebrais fornecem importantes informações sobre a capacidade do ZIKV de infectar células pluripotentes, a patogênese da infecção e suas implicações no desenvolvimento embrionário. Estudos demonstram que o ZIKV é capaz de infectar células tronco pluripotentes. Essas alterações podem levar a alterações nas estruturas encefálicas e no desenvolvimento do SNC, causando a microcefalia e outros problemas no desenvolvimento (GABRIEL *et al.*, 2017; PETTKE *et al.*, 2020; QIAN *et al.*, 2016; SOUZA *et al.*, 2016; TANG *et al.*, 2016).

Os modelos *in vivo* atualmente utilizados incluem camundongos, primatas não-humanos, embriões de galinha, suínos, porquinho-da-índia e hamsters (CUGOLA *et al.*, 2016; DENG *et al.*, 2017; PENA *et al.*, 2018; SIDDHARTHAN *et al.*, 2017; WICHGERS SCHREUR *et al.*, 2018). Os primatas não-humanos são fenotipicamente e morfológicamente mais próximos aos humanos, além disso, são naturalmente suscetíveis ao vírus, o que os torna os modelos experimentais de preferência para os estudos com ZIKV (MOHR *et al.*, 2018; PENA *et al.*, 2018). O primeiro modelo animal de infecção para ZIKV foi o macaco *Rhesus*, o qual teve uma grande importância histórica na descoberta do vírus em 1947 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952; PENA *et al.*, 2018). Contudo, as implicações éticas somadas à necessidade de uma estrutura adequada, com alto custo de manutenção e o tempo de gestação fazem com que estudos com primatas não-humanos sejam pouco realizados.

Modelos animais de camundongos são os mais utilizados em diferentes áreas da pesquisa pré-clínica. O primeiro estudo experimental que demonstrou a transmissão vertical de ZIKV foi conduzido em camundongos. Após a infecção materna com o vírus, os autores observaram principalmente restrição de crescimento e fenótipo compatível com microcefalia na prole (CUGOLA *et al.*, 2016). A principal desvantagem de usar camundongos como modelo

experimental para ZIKV é o fato de não serem naturalmente suscetíveis à infecção pelo vírus, necessitando de modelos geneticamente modificados ou imunossuprimidos (GRANT *et al.*, 2016; PENA *et al.*, 2018; XU *et al.*, 2019).

Um modelo amplamente utilizado na área de teratologia experimental que mimetiza os efeitos do ZIKV em humanos possibilitando a investigação de mecanismos de teratogênese e a triagem da segurança e efetividade de moléculas antivirais é o embrião de galinha. De fato, o primeiro estudo com ZIKV em modelos animais foi em embriões de galinha e foi publicado em 1952 (RAMOS DA SILVA, 2017; TAYLOR, 1952). O estudo utilizou ZIKV de linhagem africana, isolado de macaco infectado, e demonstrou que o vírus é capaz de infectar embriões de galinha. Outros estudos, mostraram que o vírus persisti por até nove dias após a infecção, sendo detectável em diferentes períodos dependendo do local onde foi injetado o vírus (TAYLOR, 1952). Estudos posteriores confirmaram que os embriões de galinha são susceptíveis à infecção por ZIKV e constataram que a infecção pode ser estabelecida por diferentes vias, incluindo a inoculação direta do vírus no embrião em desenvolvimento. A partir de diferentes estudos, foi possível observar que neste modelo, após a infecção pelo vírus, há o desenvolvendo fenótipos similares aos observados em humanos (CHAN *et al.*, 2016; GOODFELLOW *et al.*, 2016; THAWANI *et al.*, 2018, 2020; WACHHOLZ *et al.*, 2021a, 2021b; WAY; BOWEN; PLATT, 1976).

A partir do estabelecimento do ZIKV como um agente teratogênico em humanos, diversos estudos com diferentes modelos animais têm auxiliado na avaliação da patogênese do ZIKV. Estes estudos demonstram que o ZIKV é capaz de atravessar a barreira hemato placentária e atingir o sistema nervoso central do embrião em desenvolvimento. Estudos demonstram ainda que o ZIKV tem uma afinidade especial pelas células tronco neurais, possuindo a capacidade de interferir na proliferação e diferenciação celular (MOORE *et al.*, 2017; SOUZA *et al.*, 2016).

2.5. O embrião de galinha

A utilização de embriões de galinha (*GallusGallus*) como modelo de observacional e experimental teve seu início ainda nos anos 300 A.C., quando Aristóteles observou a morfologia e o desenvolvimento de embriões em diferentes estágios de formação. Desde então, este modelo vem sendo utilizado para diferentes estudos, contribuindo com a criação de conceitos importantes sobre biologia do desenvolvimento (STERN, 2004). Em 1907, um importante passo no uso de embriões de galinha como modelo experimental, foi a introdução da técnica de cultura *ex ovo*, permitindo a observação e manipulação do desenvolvimento embrionário de galinha fora do organismo (VERGARA; CANTO-SOLER, 2012). Em 1951, Hamburger e Hamilton tornando-se referência na pesquisa com embriões de galinha após a caracterização morfológica precisa dos estágios de desenvolvimento dos embriões (HAMBURGER; HAMILTON, 1951).

O desenvolvimento do embrião de galinha é caracterizado por estágios baseados em eventos morfológicos (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). A taxa de crescimento desses embriões é relativamente constante; embriões fertilizados ao mesmo tempo podem alcançar marcos no desenvolvimento em tempos quase idênticos. Os primeiros 20 estágios, embora não separados por intervalos de tempo iguais, duram apenas algumas horas e, portanto, permitem uma determinação precisa da idade do embrião. Os estágios subsequentes ocorrem em intervalos de 12 horas, o que é muito menos preciso (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Esta é uma das principais vantagens frente aos modelos de mamíferos, como os camundongos, uma vez que para estes, são necessários a realização de múltiplos exames de imagem ou a eutanásia materna, o que causa a interrupção do desenvolvimento (CASSINA *et al.*, 2012; TISSIÈRES *et al.*, 2020).

Várias têm sido as vantagens encontradas para o uso do embrião de galinha em relação a outros modelos, como a facilidade de obtenção de ovos, observação direta do desenvolvimento embrionário, fácil manipulação, tempo de desenvolvimento relativamente curto (21 dias até a eclosão), similaridades morfológicas e moleculares ao desenvolvimento inicial de humanos, ausência da

necessidade de grandes estruturas laboratoriais para sua manutenção e baixo custo operacional (BJØRNSTAD *et al.*, 2015; HAMBURGER; HAMILTON, 1951; VILCHES-MOURE, 2019). O sequenciamento do genoma do embrião de galinha representou um importante passo para a utilização deste modelo, pois revelou a presença de genes homólogos entre as galinhas e os seres humanos, identificando características similares compartilhadas do desenvolvimento embrionário (LÉCUYER; PARTHASARATHY; KRAUSE, 2008; RUBIN; LEWIS, 2000). Um dos principais desafios do uso deste modelo está relacionado à falta de semelhança de fertilização e concepção com os mamíferos, o que pode limitar a capacidade de extrapolação dos resultados para seres humanos (STERN, 2004).

Atualmente, no campo da teratologia experimental, os embriões de galinha tem sido utilizados como modelos para busca por mecanismos moleculares de teratógenos e avaliação do potencial teratogênico de fármacos e outras substâncias, tais como talidomida, niclosamida, cádmio e bisfenol (CAIRNS *et al.*, 2018; CULLINANE; BANNIGAN; THOMPSON, 2009; HSIEH *et al.*, 2012; MAHONY; VARGESSON, 2013; THOMPSON; BANNIGAN, 2007; VERGARA; CANTO-SOLER, 2012; VILCHES-MOURE, 2019; WACHHOLZ *et al.*, 2021a; WIENS *et al.*, 1992; YAMAMOTO *et al.*, 2012). Desta maneira, este modelo se mostra relevante para estudos com ZIKV e estudos para avaliação do potencial teratogênico e antiviral de fármacos em desenvolvimento.

2.6. Estudos com fármacos e ZIKV

A possibilidade de uma re-emergência da epidemia do ZIKV em regiões já acometidas e o risco de que se espalhe para países onde há a presença de seus vetores, mas que não houve registro de infecções pelo vírus, é preocupante. Embora a maioria dos pacientes acometidos pela infecção se recupere rapidamente, conforme mencionado anteriormente, o ZIKV é um agente teratogênico estabelecido (DEL CAMPO *et al.*, 2017a; RASMUSSEN *et al.*, 2016). Portanto, a exposição de embriões e fetos ao vírus durante a gestação pode acometer o desenvolvimento neurológico (DEL CAMPO *et al.*, 2017b; SCHULER-FACCINI, Lavinia *et al.*, 2016). Dessa forma, há uma grande

necessidade por fármacos antivirais capazes de prevenir ou tratar as anomalias que o ZIKV causa.

Além de todas as dificuldades do desenvolvimento de um alvo terapêutico, há a necessidade de um fármaco seguro para administração em gestantes. Portanto, é preciso que ele seja seguro e capaz de atravessar barreira hemato placentária, possibilitando o adequado acesso ao embrião em desenvolvimento, prevenindo a transmissão vertical do ZIKV (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; IN *et al.*, 2020). Até o presente momento, não há nenhum fármaco aprovado para o tratamento da infecção por ZIKV, mas alguns alvos terapêuticos já estão sendo definidos (PIELNAA *et al.*, 2020b; PLOTKIN; MAHMOUD; FARRAR, 2015; POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2019). Neste sentido, algumas estratégias desenvolvidas para a eliminação deste risco epidemiológico, destacam-se tratamentos como a nanotecnologias e os antivirais, que são imprescindíveis não apenas para minimizar as morbidades associadas à infecção causada pelo vírus, mas também com potencial de interferir sua transmissibilidade (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; SURNAR *et al.*, 2019). Inibidores que interferem em diferentes etapas da replicação viral, desde a entrada do vírus na célula hospedeira até sua replicação, estão sendo estudados. Moléculas capazes de dificultar a ligação da proteína do envelope viral aos receptores de entrada na célula, de interferir na função de RNA polimerases dependentes de RNA (RdRp; proteínas essenciais para a replicação viral), de prejudicar a função das proteases (responsáveis pela maturação viral), de impedir o processo de montagem da partícula viral ou de atrapalhar o processo de fusão endossomal (essencial para a entrada do vírus na célula hospedeira), são as principais classes de inibidores (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; CARNEIRO *et al.*, 2016; GAUDINSKI *et al.*, 2018; RUSSO *et al.*, 2019). Os inibidores de RdRp são considerados os melhores candidatos para o desenvolvimento clínico de inibidores de ZIKV, devido a sua eficácia no combate a infecção pelo Vírus da Hepatite C (HCV), pelo HIV e pelo vírus do herpes simples além de serem seguros (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; EYER *et al.*, 2016).

A validação dos achados *in vitro* utilizando estudos *in vivo* é uma etapa fundamental para o desenvolvimento de novos fármacos. Apesar do grande desafio, já que nem todos os animais são naturalmente suscetíveis a infecção

por ZIKV, diferentes modelos experimentais vêm sendo utilizados para a realização de estudos *in vivo* com novos alvos terapêuticos para o vírus (OHKI *et al.*, 2019). Vários desfechos positivos foram observados utilizando diferentes fármacos no tratamento de camundongos e ratos infectados com ZIKV, como aumento da sobrevivência, redução da viremia e da neuro inflamação, prevenção da morte do animal, redução partículas virais no sangue e no leite materno, atraso no aparecimento dos sinais clínicos e supressão da infecção (GRATTON *et al.*, 2019; JULANDER *et al.*, 2017; VERMILLION *et al.*, 2017). Sofosbuvir, fármaco aprovado pela agência americana de regulamentação de medicamentos, (FDA do inglês *Food and Drug Administration*) para o tratamento de Hepatite C, é classificado como categoria B em relação a segurança durante a gestação, e apresentou resultados positivos na inibição da infecção por ZIKV *in vitro* e *in vivo* (BERNATCHEZ *et al.*, 2020; MESCI *et al.*, 2018; SACRAMENTO *et al.*, 2017). Estudos que utilizaram camundongos das linhagens SJL e C57BL/6 tratado Sofosbuvir relataram a prevenção da transmissão vertical e proteção contra o desenvolvimento da doença e aumento da sobrevivência dos animais, respectivamente (BULLARD-FEIBELMAN *et al.*, 2017; MESCI *et al.*, 2018).

Além de sofosbuvir, BCX4430, um análogo de nucleosídeo de adenosina que funciona como um inibidor seletivo da RNA polimerase dependente de RNA viral também apresentou efeitos anti-ZIKV. Prévio estudo demonstrou que o BCX4430 reduz consistentemente o efeito citopático viral induzida por isolados de ZIKV, melhora significativamente a sobrevivência e o peso dos camundongos infectados pelo ZIKV e induz uma redução na viremia de maneira dose-dependente (JULANDER *et al.*, 2017). Em macacos Rhesus (*Macaca mulata*) infectados com ZIKV, foi demonstrada uma redução da carga viral em diferentes fluidos corporais após a administração da BCX4430 (LIM *et al.*, 2016).

A maioria dos compostos testados em macacos Rhesus foram anticorpos neutralizadores monoclonais, apresentando bons resultados, mas não prevenindo a transmissão vertical (KEEFFE *et al.*, 2018; MAGNANI *et al.*, 2017, 2018). Outros desfechos positivos foram observados utilizando diferentes fármacos antivirais (Galidesivir, Sofosbuvir, Remdesivir) no tratamento de macacos Rhesus infectados por ZIKV, dentre eles redução da viremia e da carga viral na urina, saliva, fluido cefalorraquidiano e plasma, redução da expressão de

citossinas, bloqueio da replicação viral, bloqueio da viremia sérica de macacas grávidas (OHKI *et al.*, 2019).

A niclosamida, um anti-helmíntico aprovado pela FDA, de categoria B com relação a segurança na gestação, reverteu parcialmente as alterações morfológicas e histológicas causadas pelo ZIKV em embriões de galinha. Nesses embriões, observou-se que altas doses de niclosamida não alteram o desenvolvimento do embrião, mesmo na ausência do ZIKV, demonstrando que este fármaco não tem efeito teratogênico nesta espécie (CAIRNS *et al.*, 2018). Os desfechos do tratamento com a fármaco foram a ausência de microcefalia nos embriões expostos ao ZIKV, aumento da abertura dos olhos e restauração parcial de alterações no prosencéfalo, espaço ventricular, redução de neurônios GABAenergéticos e diferenciação das células tronco neuronais, além de aumento na taxa de sobrevivência (CAIRNS *et al.*, 2018).

Em termos de desenvolvimento de fármacos, recentemente dois compostos recentemente desenvolvidos, TH5487 e TH6744, foram avaliados quanto a sua atividade antiviral em organoides cerebrais humanos (3D) (PETTKE *et al.*, 2020). Organoides infectados com títulos crescentes de ZIKV apresentaram alterações em sua estrutura e conseqüentemente uma redução na sua viabilidade. O tratamento com TH5487 e TH6744 em diferentes momentos após a infecção pelo ZIKV mostrou que ambos reduzem o comprometimento causado pelo ZIKV no modelo, levando a um aumento na viabilidade, diminuição na infecção primária pelo ZIKV, redução das partículas virais e um resgate ao fenotípico anterior à infecção pelo ZIKV (PETTKE *et al.*, 2020). A realização de testes *in vivo* de toxicidade destes compostos e a avaliação de seus efeitos antivirais representam um passo importante e crucial na busca por terapias contra o ZIKV. Tal etapa assegura que os compostos sejam não apenas eficazes, mas também seguros, esta etapa possibilitará que posteriormente seja transferido a outros modelos experimentais.

3. MARCO CONCEITUAL

O ZIKV é um teratígeno humano responsável por causar a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ). A associação entre a exposição ao ZIKV durante a gravidez está relacionada ao aumento de casos de microcefalia. Não existe nenhum medicamento ou vacina comprovadamente seguro que possa prevenir ou minimizar os efeitos nocivos causados pelo ZIKV no desenvolvimento embrionário. Neste sentido, a busca por alternativas farmacológicas que auxiliem neste problema de saúde pública se faz necessária. Testes de segurança com relação à toxicologia reprodutiva (efeito teratogênico) e os efeitos antivirais com fármacos em desenvolvimento são fundamentais. Embriões de galinha se mostram um modelo relevante para auxiliar no desenvolvimento de fármacos seguros e eficazes.

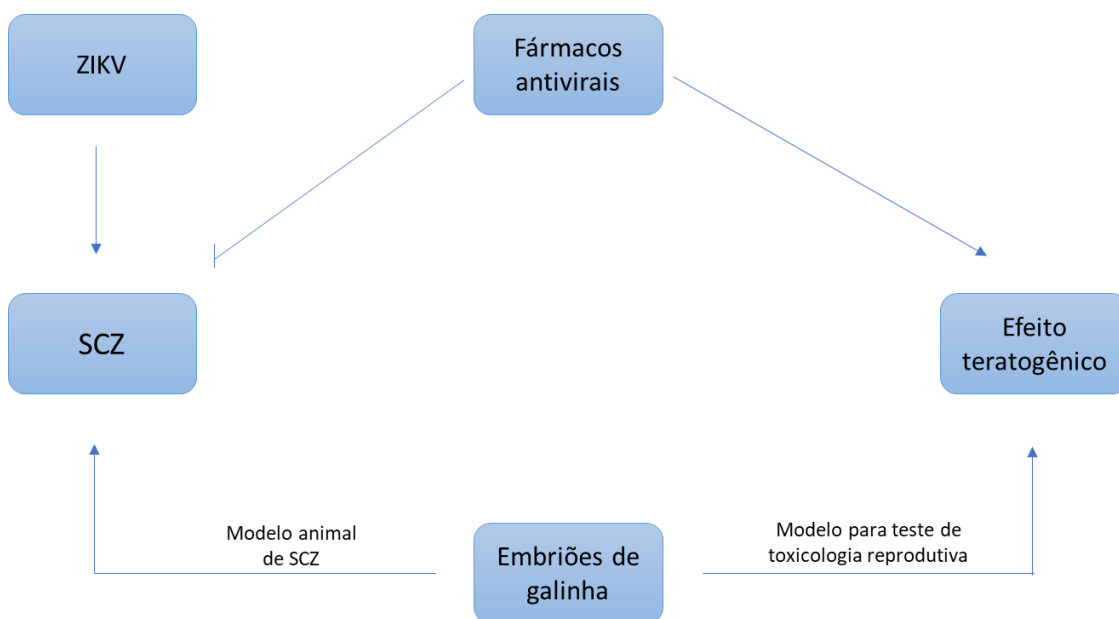


Figura 3:Esquema do marco conceitual do estudo.

4. JUSTIFICATIVA

Em 2015, o Brasil enfrentou uma das suas maiores e mais preocupantes epidemias, a do ZIKV, que ocasionou um aumento expressivo no número de casos de microcefalia, principalmente na região norte e nordeste do país. O número de casos notificados chegou a 21.196, sendo destes 1.857 classificados como casos de SCZ (BRASIL, 2023). Passados sete anos, o Brasil se encontra em seu menor patamar de notificações relacionado a notificação e a SCZ (BRASIL, 2023). Entretanto, ainda há o risco de uma reemergência de casos ou de uma epidemia em estados que não foram acometidos pelo vírus e até mesmo em locais que o vírus já afetou, visto que seus vetores possuem uma ampla distribuição espacial (KRAUER *et al.*, 2017; MARCONDES; XIMENES, 2015).

Compreender os alvos moleculares e os mecanismos que levam o ZIKV a desempenhar uma ação teratogênica no desenvolvimento embrionário, se faz necessário, associado a busca de um fármaco seguro, capaz de minimizar ou eliminar os efeitos teratogênicos causados pelo ZIKV. Até o momento não existe um fármaco que previna as ações teratogênicas do ZIKV, impedindo o aparecimento das anomalias. Entretanto muitos estudos têm sido conduzidos para melhorar o entendimento sobre os mecanismos que levam às malformações congênitas induzidas pelo ZIKV.

Recentemente dois compostos farmacológicos, foram desenvolvidos, TH5487 e TH6744 e apresentam propriedades antivirais, prevenindo os efeitos danosos do ZIKV em linhagens celulares e organoides cerebrais (PETTKE *et al.*, 2020). Entretanto, para continuar a validação e desenvolvimento desses fármacos, testes relacionados à sua segurança (testes teratogênicos) e seu potencial preventivo aos danos de ZIKV *in vivo* são necessários. Embriões de galinha têm sido utilizados em testes teratogênicos e antivirais de ZIKV, sendo modelos de fácil manipulação e de baixo custo que permitem o teste de compostos ou fármacos na prevenção das anomalias causadas pelo vírus. Um modelo de SCZ utilizando embriões de galinha está bem estabelecido e seu uso se mostra relevante, tanto para avaliar o potencial embriotóxicos destes compostos, quanto para investigar seus efeitos antivirais *in vivo*. Desta maneira, a avaliação *in vivo* destes compostos, por meio da utilização de um modelo

animal estabelecido, se faz necessário para o seguimento do desenvolvimento destes compostos.

5. OBJETIVOS

5.1. Objetivos gerais

Avaliar o potencial teratogênico e preventivo aos efeitos malformativos de ZIKV dos compostos TH5487 e TH6744 utilizando embriões de galinha como modelos experimental.

5.2. Objetivos Específicos

Avaliar o efeito de diferentes doses dos compostos TH5487 e TH6744 sobre a taxa de mortalidade de embriões de galinha.

Avaliar o efeito de diferentes doses dos compostos TH5487 e TH6744 sobre a taxa de anomalias congênitas e crescimento de embriões de galinha.

Avaliar a ação do efeito do veículo (DMSO) sobre os efeitos danosos de ZIKV em embriões de galinha.

Investigar o potencial farmacológico dos compostos TH5487 e TH6744 na redução ou prevenção do aparecimento de anomalias em embriões de galinha expostos ao ZIKV, utilizando a dose escolhida na curva de doses.

6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABRAMS, R. P. M.; SOLIS, J.; NATH, A. Therapeutic Approaches for Zika Virus Infection of the Nervous System. **Neurotherapeutics: The Journal of the American Society for Experimental NeuroTherapeutics**, [s. l.], v. 14, n. 4, p. 1027–1048, 2017.

ANDERSON, K. C. Dark Remedy: The Impact of Thalidomide and Its Revival as a Vital Medicine. **Nature Medicine**, [s. l.], v. 7, n. 3, p. 275–276, 2001.

ARAGAO, M. F. V. V. *et al.* Spectrum of Spinal Cord, Spinal Root, and Brain MRI Abnormalities in Congenital Zika Syndrome with and without Arthrogyriposis. **AJNR. American journal of neuroradiology**, [s. l.], v. 38, n. 5, p. 1045–1053, 2017.

BERNATCHEZ, J. A. *et al.* Drugs for the Treatment of Zika Virus Infection. **Journal of Medicinal Chemistry**, [s. l.], v. 63, n. 2, p. 470–489, 2020.

BJØRNSTAD, S. *et al.* Cracking the Egg: Potential of the Developing Chicken as a Model System for Nonclinical Safety Studies of Pharmaceuticals. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, [s. l.], v. 355, n. 3, p. 386–396, 2015.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico - Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika: Brasil, 2015 a 2022**. [S. l.], 2023. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2023>. Acesso em: 9 nov. 2023.

BRASIL, 2023. **Ministério da Saúde - Série histórica - Casos prováveis de Zika (2015-2023)**. [S. l.], [s. d.]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/z/zika-virus/situacao-epidemiologica/serie-historica-casos-provaveis-de-zika-2015-2023/view>. Acesso em: 9 nov. 2023.

BROWN, J. E. *et al.* Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution; International Journal of Organic Evolution**, [s. l.], v. 68, n. 2, p. 514–525, 2014.

BULLARD-FEIBELMAN, K. M. *et al.* The FDA-approved drug sofosbuvir inhibits Zika virus infection. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 137, p. 134–140, 2017.

CAIRNS, D. M. *et al.* Niclosamide rescues microcephaly in a humanized in vivo model of Zika infection using human induced neural stem cells. **Biology Open**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. bio031807, 2018.

CALADO, A. M.; DOS ANJOS PIRES, M. An Overview of Teratology. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 1797, p. 3–32, 2018.

- 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**, [s. l.], v. 16, n. 6, p. 653–660, 2016.
- CAMPOS, G. S.; BANDEIRA, A. C.; SARDI, S. I. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 21, n. 10, p. 1885–1886, 2015.
- CARNEIRO, B. M. *et al.* The green tea molecule EGCG inhibits Zika virus entry. **Virology**, [s. l.], v. 496, p. 215–218, 2016.
- CARVALHO, R. G.; LOURENÇO-DE-OLIVEIRA, R.; BRAGA, I. A. Updating the geographical distribution and frequency of *Aedes albopictus* in Brazil with remarks regarding its range in the Americas. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 109, n. 6, p. 787–796, 2014.
- CASSINA, M. *et al.* Genetic susceptibility to teratogens: state of the art. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 186–191, 2012.
- CHAN, J. F.-W. *et al.* Differential cell line susceptibility to the emerging Zika virus: implications for disease pathogenesis, non-vector-borne human transmission and animal reservoirs. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 5, n. 8, p. e93, 2016.
- COELHO, G. E. Challenges in the control of *Aedes aegypti*. **Revista Do Instituto De Medicina Tropical De Sao Paulo**, [s. l.], v. 54 Suppl 18, p. S13-14, 2012.
- COOPER, M. Regenerative medicine: stem cells and the science of monstrosity. **Medical Humanities**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 12–22, 2004.
- CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, [s. l.], v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016.
- CULLINANE, J.; BANNIGAN, J.; THOMPSON, J. Cadmium teratogenesis in the chick: period of vulnerability using the early chick culture method, and prevention by divalent cations. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, [s. l.], v. 28, n. 3, p. 335–341, 2009.
- DE ARAÚJO, T. V. B. *et al.* Association between Zika virus infection and microcephaly in Brazil, January to May, 2016: preliminary report of a case-control study. **The Lancet. Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 12, p. 1356–1363, 2016.
- DEL CAMPO, M. *et al.* The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, [s. l.], v. 173, n. 4, p. 841–857, 2017a.
- DEL CAMPO, M. *et al.* The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. **American Journal of Medical Genetics. Part A**, [s. l.], v. 173, n. 4, p. 841–857, 2017b.

DENG, Y.-Q. *et al.* Intranasal infection and contact transmission of Zika virus in guinea pigs. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1648, 2017.

DESESSO, J. M. The arrogance of teratology: A brief chronology of attitudes throughout history. **Birth Defects Research**, [s. l.], v. 111, n. 3, p. 123–141, 2019.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DICKE, J. M. Teratology: principles and practice. **The Medical Clinics of North America**, [s. l.], v. 73, n. 3, p. 567–582, 1989.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009.

EMA, M. *et al.* Fetal malformations and early embryonic gene expression response in cynomolgus monkeys maternally exposed to thalidomide. **Reproductive Toxicology (Elmsford, N.Y.)**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 49–56, 2010.

EYER, L. *et al.* Nucleoside Inhibitors of Zika Virus. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 214, n. 5, p. 707–711, 2016.

FARIA, N. R. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 352, n. 6283, p. 345–349, 2016.

FINNELL, R. H. Teratology: general considerations and principles. **The Journal of Allergy and Clinical Immunology**, [s. l.], v. 103, n. 2 Pt 2, p. S337-342, 1999.

FRAGA, L. R. *et al.* Editorial: Teratogenesis: Experimental Models, Mechanisms and Clinical Findings in Humans. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 13, p. 901400, 2022.

FRAGA, L.; DIAMOND, A.; VARGESSON, N. Thalidomide and birth defects. **eLS**, [s. l.], v. January 2016, p. 1–11, 2016.

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

GABRIEL, E. *et al.* Recent Zika Virus Isolates Induce Premature Differentiation of Neural Progenitors in Human Brain Organoids. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 397-406.e5, 2017.

GAUDINSKI, M. R. *et al.* Safety, tolerability, and immunogenicity of two Zika virus DNA vaccine candidates in healthy adults: randomised, open-label, phase 1 clinical trials. **Lancet (London, England)**, [s. l.], v. 391, n. 10120, p. 552–562, 2018.

GOODFELLOW, F. T. *et al.* Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 1691–1697, 2016.

GRANT, A. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.

GRATTON, R. *et al.* Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. **International Journal of Molecular Sciences**, [s. l.], v. 20, n. 5, p. 1048, 2019.

GREGG, N. M. Congenital cataract following German measles in the mother. 1941. **Epidemiology and Infection**, [s. l.], v. 107, n. 1, p. iii–xiv, 1991.

HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS neglected tropical diseases**, [s. l.], v. 6, n. 2, p. e1477, 2012.

HAMBURGER, V.; HAMILTON, H. L. A series of normal stages in the development of the chick embryo. **Journal of Morphology**, [s. l.], v. 88, n. 1, p. 49–92, 1951.

HSIEH, C.-L. *et al.* Multiple point action mechanism of valproic acid-teratogenicity alleviated by folic acid, vitamin C, and N-acetylcysteine in chicken embryo model. **Toxicology**, [s. l.], v. 291, n. 1–3, p. 32–42, 2012.

IN, H. J. *et al.* Enhanced effect of modified Zika virus E antigen on the immunogenicity of DNA vaccine. **Virology**, [s. l.], v. 549, p. 25–31, 2020.

IOOS, S. *et al.* Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine Et Maladies Infectieuses**, [s. l.], v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JANER, G. *et al.* A retrospective analysis of developmental toxicity studies in rat and rabbit: what is the added value of the rabbit as an additional test species?. **Regulatory toxicology and pharmacology: RTP**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 206–217, 2008.

JULANDER, J. G. *et al.* Efficacy of the broad-spectrum antiviral compound BCX4430 against Zika virus in cell culture and in a mouse model. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 137, p. 14–22, 2017.

KAMIYAMA, N. *et al.* Ribavirin inhibits Zika virus (ZIKV) replication in vitro and suppresses viremia in ZIKV-infected STAT1-deficient mice. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 146, p. 1–11, 2017.

KEEFFE, J. R. *et al.* A Combination of Two Human Monoclonal Antibodies Prevents Zika Virus Escape Mutations in Non-human Primates. **Cell Reports**, [s. l.], v. 25, n. 6, p. 1385-1394.e7, 2018.

KRAUER, F. *et al.* Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barré Syndrome: Systematic Review. **PLoS medicine**, [s. l.], v. 14, n. 1, p. e1002203, 2017.

LÉCUYER, E.; PARTHASARATHY, N.; KRAUSE, H. M. Fluorescent in situ hybridization protocols in *Drosophila* embryos and tissues. **Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 420, p. 289–302, 2008.

LIM, S.-Y. *et al.* BCX4430, a Broad-Spectrum Adenosine Analog Direct-Acting Antiviral Drug, Abrogates Viremia in Rhesus Macaques Challenged With Zika Virus. **Open Forum Infectious Diseases**, [s. l.], v. 3, n. suppl_1, p. LB-5, 2016.

LINDEN, V. van der. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, [s. l.], v. 65, 2016. Disponível em: <https://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm>. Acesso em: 8 nov. 2023.

LIU, Y. *et al.* Reviewing estimates of the basic reproduction number for dengue, Zika and chikungunya across global climate zones. **Environmental Research**, [s. l.], v. 182, p. 109114, 2020.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MAGNANI, D. M. *et al.* Fetal demise and failed antibody therapy during Zika virus infection of pregnant macaques. **Nature Communications**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 1624, 2018.

MAGNANI, D. M. *et al.* Neutralizing human monoclonal antibodies prevent Zika virus infection in macaques. **Science Translational Medicine**, [s. l.], v. 9, n. 410, p. eaan8184, 2017.

MAHONY, C. *et al.* Pomalidomide is nonteratogenic in chicken and zebrafish embryos and nonneurotoxic in vitro. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, [s. l.], v. 110, n. 31, p. 12703–12708, 2013.

MAHONY, C.; VARGESSON, N. Molecular analysis of regulative events in the developing chick limb. **Journal of Anatomy**, [s. l.], v. 223, n. 1, p. 1–13, 2013.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. de F. F. de M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitoes. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, [s. l.], v. 49, p. 4–10, 2015.

MARINHO, F. *et al.* Microcephaly in Brazil: prevalence and characterization of cases from the Information System on Live Births (Sinasc), 2000-2015. **Epidemiologia E Servicos De Saude: Revista Do Sistema Unico De Saude Do Brasil**, [s. l.], v. 25, n. 4, p. 701–712, 2016.

MARRS, C. *et al.* Zika Virus and Pregnancy: A Review of the Literature and Clinical Considerations. **American Journal of Perinatology**, [s. l.], v. 33, n. 7, p. 625–639, 2016.

- MEDIN, C. L.; ROTHMAN, A. L. Zika Virus: The Agent and Its Biology, With Relevance to Pathology. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 33–42, 2017.
- MENDONÇA, F. de A.; SOUZA, A. V. e; DUTRA, D. de A. Saúde pública, urbanização e dengue no Brasil. **Sociedade & Natureza**, [s. l.], v. 21, p. 257–269, 2009.
- MESCI, P. *et al.* Blocking Zika virus vertical transmission. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1218, 2018.
- MOHR, E. L. *et al.* Ocular and uteroplacental pathology in a macaque pregnancy with congenital Zika virus infection. **PloS One**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. e0190617, 2018.
- MOORE, C. A. *et al.* Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. **JAMA pediatrics**, [s. l.], v. 171, n. 3, p. 288–295, 2017.
- MUSSO, D. *et al.* Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Euro Surveillance: Bulletin European Sur Les Maladies Transmissibles = European Communicable Disease Bulletin**, [s. l.], v. 19, n. 14, p. 20761, 2014.
- NYARUABA, R. *et al.* Arboviruses in the East African Community partner states: a review of medically important mosquito-borne Arboviruses. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 113, n. 5, p. 209–228, 2019.
- OHKI, C. M. Y. *et al.* Developing animal models of Zika virus infection for novel drug discovery. **Expert Opinion on Drug Discovery**, [s. l.], v. 14, n. 6, p. 577–589, 2019.
- OLIVEIRA, M. A.; BERMUDEZ, J. A. Z.; SOUZA, A. C. M. de. Talidomida no Brasil: vigilância com responsabilidade compartilhada?. **Cadernos de Saúde Pública**, [s. l.], v. 15, p. 99–112, 1999.
- PENA, L. J. *et al.* In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. **The Journal of General Virology**, [s. l.], v. 99, n. 12, p. 1529–1550, 2018.
- PETTKE, A. *et al.* Broadly Active Antiviral Compounds Disturb Zika Virus Progeny Release Rescuing Virus-Induced Toxicity in Brain Organoids. **Viruses**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 37, 2020.
- PIELNAA, P. *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, [s. l.], v. 543, p. 34–42, 2020a.
- PIELNAA, P. *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, [s. l.], v. 543, p. 34–42, 2020b.

PLOTKIN, S. A.; MAHMOUD, A. A. F.; FARRAR, J. Establishing a Global Vaccine-Development Fund. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 373, n. 4, p. 297–300, 2015.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, [s. l.], v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. Zika Vaccine Development: Current Status. **Mayo Clinic Proceedings**, [s. l.], v. 94, n. 12, p. 2572–2586, 2019.

POLONIO, C. M. *et al.* Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [s. l.], v. 23, p. 41, 2017.

QIAN, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, [s. l.], v. 165, n. 5, p. 1238–1254, 2016.

RAMOS DA SILVA, S. First Published Study with Embryonated Hen Egg Infected with Zika Virus Is Dated from 1952. **Stem Cells and Development**, [s. l.], v. 26, n. 12, p. 875–875, 2017.

RASMUSSEN, S. A. *et al.* Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality. **The New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016.

RIBEIRO, B. N. de F. *et al.* Congenital Zika syndrome and neuroimaging findings: what do we know so far?. **Radiologia Brasileira**, [s. l.], v. 50, n. 5, p. 314–322, 2017.

RUBIN, G. M.; LEWIS, E. B. A brief history of Drosophila's contributions to genome research. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 287, n. 5461, p. 2216–2218, 2000.

RUSSO, R. R. *et al.* Expression, purification and virucidal activity of two recombinant isoforms of phospholipase A2 from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 164, n. 4, p. 1159–1171, 2019.

SACRAMENTO, C. Q. *et al.* The clinically approved antiviral drug sofosbuvir inhibits Zika virus replication. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 7, p. 40920, 2017.

SADLER, T. W. **Langman's Medical Embryology**. [S. l.]: Wolters Kluwer, 2019.

SADLER, T. W. **Langman's Medical Embryology**. [S. l.]: Lippincott Williams & Wilkins, 2022.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Neurodevelopment in Children Exposed to Zika in utero: Clinical and Molecular Aspects. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 13, p. 758715, 2022.

SCHULER-FACCINI, Lavinia *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, [s. l.], v. 65, n. 3, p. 59–62, 2016.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Zika virus: A new human teratogen? Implications for women of reproductive age. **Clinical Pharmacology and Therapeutics**, [s. l.], v. 100, n. 1, p. 28–30, 2016.

SHEPARD, T. H. “Proof” of human teratogenicity. **Teratology**, [s. l.], v. 50, n. 2, p. 97–98, 1994.

SIDDHARTHAN, V. *et al.* Zika virus infection of adult and fetal STAT2 knock-out hamsters. **Virology**, [s. l.], v. 507, p. 89–95, 2017.

SMITHBURN, K. C.; HADDOW, A. J. Ntaya virus; a hitherto unknown agent isolated from mosquitoes collected in Uganda. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine. Society for Experimental Biology and Medicine (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 77, n. 1, p. 130–133, 1951.

SMITHELLS, R. W.; NEWMAN, C. G. Recognition of thalidomide defects. **Journal of Medical Genetics**, [s. l.], v. 29, n. 10, p. 716–723, 1992.

SOARES DE OLIVEIRA-SZEJNFELD, P. *et al.* Congenital Brain Abnormalities and Zika Virus: What the Radiologist Can Expect to See Prenatally and Postnatally. **Radiology**, [s. l.], v. 281, n. 1, p. 203–218, 2016.

SONG, B.-H. *et al.* Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 308, p. 50–64, 2017.

SOUZA, B. S. F. *et al.* Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 6, p. 39775, 2016.

STERN, C. D. The chick embryo – past, present and future as a model system in developmental biology. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 121, n. 9, The Chick in Developmental Biology, p. 1011–1013, 2004.

SURNAR, B. *et al.* Orally Administrable Therapeutic Synthetic Nanoparticle for Zika Virus. **ACS nano**, [s. l.], v. 13, n. 10, p. 11034–11048, 2019.

TAJIMA, T. *et al.* Internal anomalies in thalidomide embryopathy: results of imaging screening by CT and MRI. **Clinical Radiology**, [s. l.], v. 71, n. 11, p. 1199.e1-7, 2016.

TANG, H. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 587–590, 2016.

TAYLOR, R. M. Studies on certain viruses isolated in the tropics of Africa and South America; their growth and behavior in the embryonated hen egg. **Journal of Immunology (Baltimore, Md.: 1950)**, [s. l.], v. 68, n. 4, p. 473–494, 1952.

THAWANI, A. *et al.* Zika virus can directly infect and damage the auditory and vestibular components of the embryonic chicken inner ear. **Developmental Dynamics: An Official Publication of the American Association of Anatomists**, [s. l.], v. 249, n. 7, p. 867–883, 2020.

THAWANI, A. *et al.* Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. **Cell Reports**, [s. l.], v. 23, n. 3, p. 692–700, 2018.

THOMPSON, J. M.; BANNIGAN, J. G. Omphalocele induction in the chick embryo by administration of cadmium. **Journal of Pediatric Surgery**, [s. l.], v. 42, n. 10, p. 1703–1709, 2007.

TISSIÈRES, V. *et al.* Gene Regulatory and Expression Differences between Mouse and Pig Limb Buds Provide Insights into the Evolutionary Emergence of Artiodactyl Traits. **Cell Reports**, [s. l.], v. 31, n. 1, 2020. Disponível em: [https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247\(20\)30368-5](https://www.cell.com/cell-reports/abstract/S2211-1247(20)30368-5). Acesso em: 8 nov. 2023.

UJHÁZY, E. *et al.* Teratology - past, present and future. **Interdisciplinary Toxicology**, [s. l.], v. 5, n. 4, p. 163–168, 2012.

VARGESSON, N. Thalidomide Embryopathy: An Enigmatic Challenge. **International Scholarly Research Notices**, [s. l.], v. 2013, p. e241016, 2013.

VARGESSON, N. *et al.* Thalidomide upper limb embryopathy - pathogenesis, past and present management and future considerations. **The Journal of Hand Surgery, European Volume**, [s. l.], v. 48, n. 8, p. 699–709, 2023.

VARGESSON, N. Thalidomide-induced teratogenesis: history and mechanisms. **Birth Defects Research. Part C, Embryo Today: Reviews**, [s. l.], v. 105, n. 2, p. 140–156, 2015.

VARGESSON, N. The teratogenic effects of thalidomide on limbs. **The Journal of Hand Surgery, European Volume**, [s. l.], v. 44, n. 1, p. 88–95, 2019.

VARGESSON, N.; FRAGA, L. Teratogenesis. **eLS**, [s. l.], p. 1–7, 2017.

VARGESSON, N.; STEPHENS, T. Thalidomide: history, withdrawal, renaissance, and safety concerns. **Expert Opinion on Drug Safety**, [s. l.], v. 20, n. 12, p. 1455–1457, 2021.

VEGA-RÚA, A. *et al.* High level of vector competence of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* from ten American countries as a crucial factor in the spread of Chikungunya virus. **Journal of Virology**, [s. l.], v. 88, n. 11, p. 6294–6306, 2014.

VERGARA, M. N.; CANTO-SOLER, M. V. Rediscovering the chick embryo as a model to study retinal development. **Neural Development**, [s. l.], v. 7, p. 22, 2012.

- VERMILLION, M. S. *et al.* Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. **Nature Communications**, [s. l.], v. 8, p. 14575, 2017.
- VILCHES-MOURE, J. G. Embryonic Chicken (*Gallus gallus domesticus*) as a Model of Cardiac Biology and Development. **Comparative Medicine**, [s. l.], v. 69, n. 3, p. 184–203, 2019.
- WACHHOLZ, G. E. *et al.* From the Farm to the Lab: How Chicken Embryos Contribute to the Field of Teratology. **Frontiers in Genetics**, [s. l.], v. 12, p. 666726, 2021a.
- WACHHOLZ, G. E. *et al.* Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos. **Birth Defects Research**, [s. l.], v. 113, n. 1, p. 22–31, 2021b.
- WARKANY, J.; NELSON, R. C. APPEARANCE OF SKELETAL ABNORMALITIES IN THE OFFSPRING OF RATS REARED ON A DEFICIENT DIET. **Science (New York, N.Y.)**, [s. l.], v. 92, n. 2391, p. 383–384, 1940.
- WAY, J. H.; BOWEN, E. T.; PLATT, G. S. Comparative studies of some African arboviruses in cell culture and in mice. **The Journal of General Virology**, [s. l.], v. 30, n. 1, p. 123–130, 1976.
- WEAVER, S. C. *et al.* Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, [s. l.], v. 130, p. 69–80, 2016.
- WICHGERS SCHREUR, P. J. *et al.* Microencephaly in fetal piglets following in utero inoculation of Zika virus. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 7, n. 1, p. 42, 2018.
- WIENS, D. J. *et al.* Early heart development in the chick embryo: effects of isotretinoin on cell proliferation, alpha-actin synthesis, and development of contractions. **Differentiation; Research in Biological Diversity**, [s. l.], v. 51, n. 2, p. 105–112, 1992.
- WILLARD, K. A. *et al.* Zika Virus Exhibits Lineage-Specific Phenotypes in Cell Culture, in *Aedes aegypti* Mosquitoes, and in an Embryo Model. **Viruses**, [s. l.], v. 9, n. 12, p. 383, 2017.
- XU, D. *et al.* Update on the Animal Models and Underlying Mechanisms for ZIKV-Induced Microcephaly. **Annual Review of Virology**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. 459–479, 2019.
- YAMAMOTO, F. Y. *et al.* Cadmium effects on early development of chick embryos. **Environmental Toxicology and Pharmacology**, [s. l.], v. 34, n. 2, p. 548–555, 2012.
- ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias Do Instituto Oswaldo Cruz**, [s. l.], v. 110, n. 4, p. 569–572, 2015.

7. ARTIGO

Em preparação para submissão na revista *Pharmaceutics*.

8. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O vírus Zika é um teratógeno humano recentemente estabelecido e até o momento não existem fármacos ou vacinas comprovadamente seguros para prevenir a transmissão vertical e o surgimento das anomalias por ele ocasionadas (PIELNAA *et al.*, 2020). A possibilidade de uma re-emergência da epidemia deste vírus ou a sua disseminação em regiões geográficas ainda não acometidas, torna o ZIKV um problema de saúde mundial.

Neste sentido, o presente trabalho buscou contribuir para o desenvolvimento de um fármaco anti-ZIKV. Para isso, utilizamos embriões de galinha como modelo experimental tanto para conduzir testes de segurança (testes teratogênicos) quanto para avaliar seu potencial antiviral. Nesses testes, utilizamos um modelo de embrião de galinha para a Síndrome Congênita do ZIKV. Inicialmente determinamos a segurança dos compostos TH5487 e TH6744, por meio da aplicação de diferentes concentrações desses, realizando diferentes tipos de análises para avaliar taxas de mortalidade, o aparecimento de anomalias, malformações e alterações de membros. Podemos salientar que nesta etapa de avaliação os compostos se mostram seguros, não sendo responsáveis por quaisquer alterações no desenvolvimento e pelo aumento da taxa de mortalidade, mostrando que os compostos não são teratogênicos em embriões de galinha. Os eventos adversos encontrados podem ser atribuídos a manipulação, visto que em todos os grupos apresentaram pequenas alterações, relacionadas a membros e fechamento da parede abdominal, essas alterações foram observadas até mesmo nos grupos controles.

Até o momento, poucos estudos avaliaram o potencial anti-ZIKV de compostos farmacológicos, especialmente estudos que avaliam a prevenção dos efeitos do ZIKV no desenvolvimento embrionário. Neste sentido avaliamos o potencial dos compostos TH5487 e TH6744, em reduzir ou eliminar os danos causados pelo ZIKV em momentos diferentes após aplicação do vírus (24 ou 72 horas pós-infecção – hpi). O tratamento com TH5487 e TH6744 em diferentes momentos mostrou que ambos reduzem os danos causados pelo ZIKV em embriões de galinha. Foi observado que ambos compostos apresentaram a capacidade de resgatar o fenótipo de embriões de galinha, entretanto o TH6744

mostrou-se influenciado de forma tempo-dependente, sendo mais eficaz quando há intervenção medicamentosa nas primeiras 24hpi, enquanto o TH5487 demonstrou uma janela terapêutica maior, sendo eficaz independentemente do momento da administração.

Finalmente, os achados deste trabalho apontam para a caracterização *in vivo* de novos compostos com atividade antiviral contra o ZIKV, demonstrando que esses compostos podem afetar a infecção e os danos causados pelo vírus nos embriões de galinha, resgatando o fenótipo dos embriões. Ainda, é de grande importância que a pesquisa continue a avançar, seguindo todas as etapas necessárias a fim de que essas descobertas terapêuticas possam ser futuramente aplicadas.

9. PERSPECTIVAS FUTURAS

À medida que buscamos enfrentar desafios relacionados à disseminação do vírus Zika e toda complicação que este agente causa, há necessidade de terapias eficazes e seguras, sendo essencial explorar abordagens inovadoras. O presente estudo apresentou dois novos compostos com potenciais antivirais, utilizando o modelo de embriões de galinha. Neste sentido, a continuação e a elaboração de testes complementares são passos fundamentais a serem realizados em seguida. Primeiramente, é importante avaliar a carga de ZIKV nos diferentes grupos estudados a fim de comparar se os fármacos estão reduzindo a carga viral de ZIKV em embriões tratados. Ainda no modelo avaliado, é importante realizar análises histológicas para avaliação das alterações nos tecidos cerebrais afetados pelo vírus e tratados pelos compostos. Neste mesmo sentido, análises de expressão de genes importantes para o desenvolvimento encefálico são importantes para avaliar se os fármacos são capazes de influenciar na expressão desses. A integração de dados de expressão gênica com dados de quantificação viral permitirá uma compreensão mais completa das interações vírus, embrião e resposta ao composto. Finalmente, a avaliação com outros modelos experimentais, incluindo mamíferos, permitirá uma maior compreensão do funcionamento destes fármacos, avaliando sua segurança em termos de toxicologia reprodutiva e do desenvolvimento, bem como a resposta do ZIKV mediante aos compostos em diferentes contextos.