

Cérebros em miniatura: organoides cultivados no Laboratório de Células-tronco da USP e usados em testes com o vírus zika

# Zika<sup>BR</sup>

Após demonstrarem que vírus brasileiro causa microcefalia, pesquisadores começam a investigar outros fatores que podem contribuir para danos neurológicos

Ricardo Zorzetto

**P**esquisadores de São Paulo e de outros estados dão por encerrada a fase inicial da investigação da influência do vírus zika sobre os casos de microcefalia. Seis meses após surgirem as primeiras evidências de que esse agente infeccioso estaria por trás do nascimento de crianças com o cérebro pequeno demais para a idade gestacional, as equipes brasileiras que estudam essa conexão julgam que já existe informação suficiente para afirmar que o zika causa microcefalia e danos neurológicos.

Várias condições necessárias para comprovar a relação de causa e efeito foram atendidas. Nesse período, registraram-se casos de mulheres infectadas na gestação que tiveram bebês com microcefalia e se verificou que o vírus atravessa a placenta. Identificaram-se particularidades que diferenciam a microcefalia associada ao zika de outras formas do problema e se confirmou a predileção do vírus pelas células do sistema nervoso. Em maio, veio a comprovação que faltava: uma equipe paulista apresentou um modelo animal de microcefalia.

Os pesquisadores usaram a variedade do vírus em circulação no Brasil e demonstraram que ela é mais agressiva do que a africana, isolada em 1947 de um macaco. Na Universidade de São Paulo (USP), o grupo do neuroimunologista Jean Pierre Peron inoculou o vírus em

fêmeas de camundongo grávidas e acompanhou a gestação. A cepa brasileira, a ZIKV<sup>BR</sup>, atravessa a placenta de fêmeas de uma variedade de roedores mais suscetível à infecção por vírus e prejudica o desenvolvimento dos filhotes.

Os roedores nascem com menos da metade do peso normal, têm o cérebro menor e apresentam danos no tecido cerebral semelhantes aos causados pelo zika nos seres humanos. Assim como o vírus africano, o zika brasileiro invade e danifica preferencialmente os progenitores neurais, células que originam os diferentes tipos de células cerebrais e são abundantes no início do desenvolvimento do feto. Mas a variedade brasileira causa morte celular mais acentuada.

Apresentado em 11 de maio na revista *Nature*, esse modelo permitirá, segundo os pesquisadores, investigar detalhes do mecanismo de lesão do vírus e fazer testes iniciais de compostos candidatos a vacina e a medicamento contra o zika. “Antes não era possível saber se era realmente o zika ou se havia outro fator associado provocando os casos de malformação no Brasil”, conta o neurocientista brasileiro Alysson Muotri, pesquisador da Universidade da Califórnia em San Diego e coautor do estudo. “Nosso trabalho mostra que o zika brasileiro é suficiente para causar microcefalia e outros problemas congênitos”, diz.

“Equacionamos um problema importantíssimo”, afirma o virologista Paulo Zanotto, da USP, um dos autores do estudo. Zanotto coordena a Rede Zika, um consórcio de quase 50 laboratórios paulistas que investigam o vírus com apoio da FAPESP. Ele sabe que nem tudo está resolvido. “Agora”, diz, “precisamos entender a complexidade da epidemia e acompanhar a evolução cognitiva das crianças com microcefalia”.

## FRAGILIDADE IMUNE

Mesmo a variedade mais agressiva do vírus só causou microcefalia nos filhotes de roedores de uma linhagem menos resistente a infecções virais. No Laboratório de Interações Neuroimunes da USP, Peron e sua equipe injetaram o vírus na corrente sanguínea de fêmeas de camundongo prenhes de duas linhagens – a C57BL/6, com sistema de defesa mais robusto, e a SLJ, cujas células produzem menos interferon, um sinalizador químico que as protege da invasão viral. Só os filhotes da linhagem SLJ nasceram menores, sinal de que sofreram restrição de crescimento no útero, e apresentavam danos no cérebro. “Esse modelo parece simular bem o que ocorre na gestação, período em que o sistema imunológico sofre alguma supressão e pode ficar mais suscetível a infecções”, conta a neurocientista Patrícia Beltrão Braga, chefe do

Laboratório de Células-tronco da USP e uma das coordenadoras do estudo.

Segundo Peron, esses resultados podem explicar por que nem toda mulher infectada por zika na gestação vai ter um filho com microcefalia. “As características genéticas da mãe parecem importantes para impedir o vírus de chegar ao feto”, diz. Uma de suas hipóteses é de que mulheres com certas variações nos genes que contêm a receita para produzir interferon ou que regulam sua síntese sejam mais suscetíveis à infecção pelo vírus e a ter bebê com microcefalia.

#### MAIS AGRESSIVO

A confirmação mais contundente de que o zika brasileiro é mais agressivo do que o africano veio dos experimentos feitos no laboratório de Patrícia Braga. Ela e sua equipe extraem células-tronco do dente de leite de crianças saudáveis e as reprogramam quimicamente para se transformarem em células mais versáteis, os progenitores neurais. Cultivados em suspensão em um líquido nutritivo, os progenitores formam esferas microscópicas (neuroesferas). Com o tempo, as células da neuroesfera originam diferentes tipos celulares que se organizam em camadas como se fossem minicérebros.

## Zika brasileiro causou mais danos a neuroesferas e minicérebros do que o africano

No laboratório de Patrícia, as biólogas Fernanda Cugola, Isabella Fernandes e Fabiele Russo infectaram as neuroesferas e os minicérebros com a variedade brasileira e a africana do zika. Já no primeiro dia, os dois tipos de vírus invadiram os progenitores neurais e começaram a se multiplicar. No quarto dia, as neuroesferas infectadas pelo ZIKV<sup>BR</sup> tinham um quarto do tamanho das infectadas pelo vírus africano e quase um décimo do tamanho das que não tinham vírus. O zika também causou deformações em sua

estrutura. E, quanto maior a quantidade de vírus, mais intensos eram os danos.

Além de deformar as neuroesferas, o vírus impediu que suas células migrassem, fenômeno em que se deslocam e povoam diferentes regiões cerebrais. Minicérebros com zika brasileiro apresentaram redução da espessura da camada que origina o córtex, a camada mais superficial do cérebro e a mais afetada nos bebês com microcefalia causada por zika.

As alterações no tamanho e na estrutura das neuroesferas e dos minicérebros são decorrentes da morte de suas células, que parecem ocorrer de duas formas: apoptose ou morte programada, na qual a célula murcha em face de sinais indicando que não poderá recuperar seu funcionamento normal; e autofagia, em que bolsas contendo ácidos e enzimas se rompem e digerem o conteúdo celular.

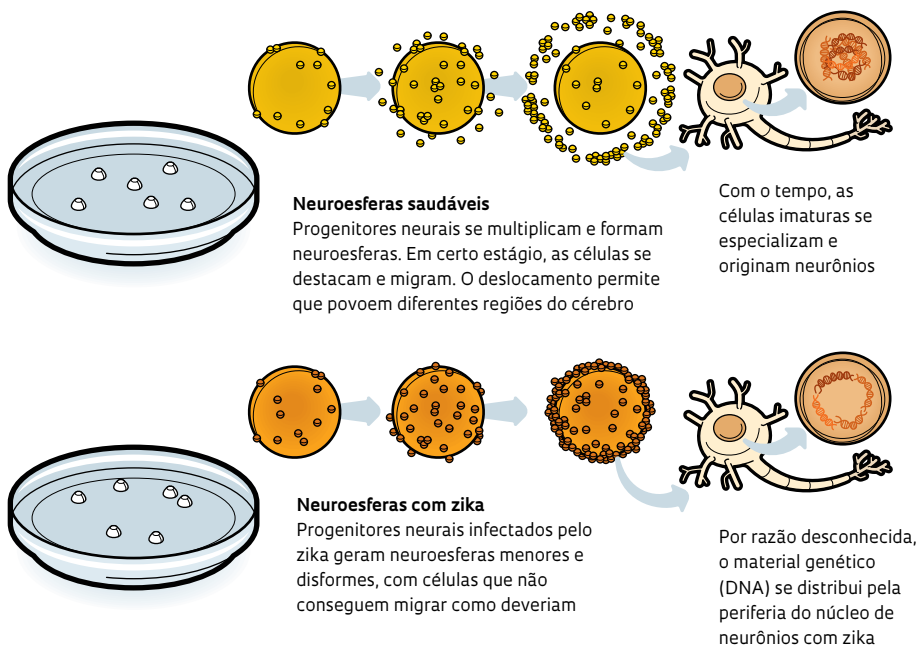
No caso do zika, a morte por apoptose é precedida de desarranjos identificados pelo grupo de Patrícia Garcez e Stevens Rehen, neurocientistas da Universidade Federal do Rio de Janeiro e do Instituto D’Or de Pesquisa e Ensino. A equipe do Rio infectou progenitores neurais com zika e, três dias depois, pediu para Jaina Vasconcelos e João Vianez Júnior, do Instituto Evandro Chagas, em Belém, analisarem o padrão de ativação dos genes, e para Juliana Nascimento, Juliana Cassoli e Daniel Martins de Souza, da Universidade Estadual de Campinas, identificarem as proteínas que estavam sendo produzidas.

Combinadas, essas estratégias revelaram que, uma vez nas células, o vírus zika passa a controlar o funcionamento delas. Ele impede os progenitores neurais de se multiplicarem e evita que as ordens para o reparo de danos sejam executadas. Também obriga a maquinaria da célula a produzir cópias do vírus. Impossibilitada de retomar a rotina, a célula aciona os mecanismos de autodestruição.

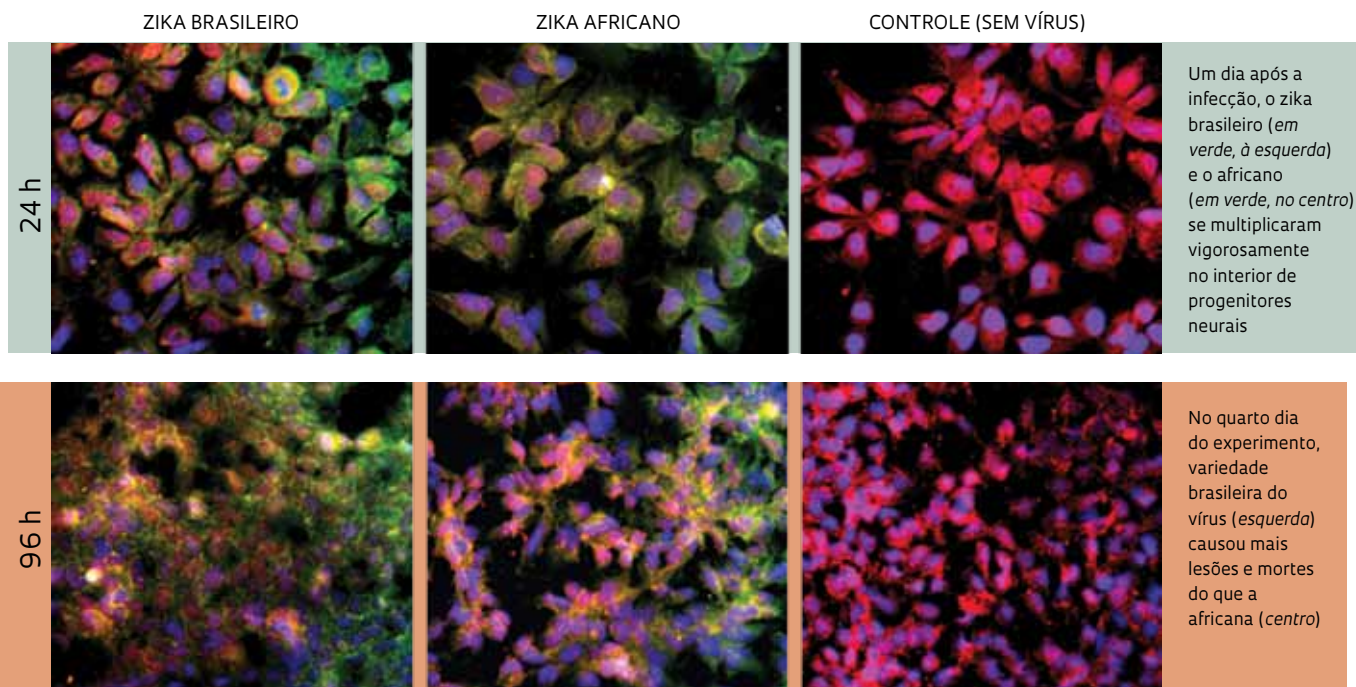
A morte dos progenitores neurais, entretanto, explica apenas parte da redução no número de neurônios. O vírus também desativa a programação que orienta essas células a se transformarem em neurônios. “Já sabíamos que as células morriam, mas a morte celular pode afetar de modos distintos a produção de neurônios”, diz Patrícia Garcez. “Identificar essas vias moleculares talvez nos leve a descobrir formas de bloquear a infecção”, diz a neurocientista, que planeja

## Destruição em massa

Zika mata as células e causa alterações no tamanho e na estrutura das neuroesferas



FONTE PATRÍCIA BELTRÃO BRAGA / USP



investigar fatores que podem favorecer a passagem do vírus da mãe para o feto.

Esse é, aliás, um dos interesses atuais de Zanotto. Ele e seus colaboradores tentam descobrir se e como outras infecções que a mãe teve antes da gestação ou na gravidez facilitam o acesso do vírus ao feto. Em maio, Zanotto e o médico Mauro Hanaoka descreveram um dos primeiros casos de microcefalia por zika registrados no estado de São Paulo. O bebê é uma menina que nasceu em novembro, na 38ª semana de gestação. Ela é filha de uma mulher de 32 anos que mora em Santos e teve dengue em 2013, além de sinais de infecção por zika no início da gestação. Em julho, quando a mulher tratou uma infecção respiratória, os médicos notaram que o bebê tinha microcefalia e encaminharam o caso para São Paulo. Análises do sangue materno revelaram a presença de anticorpos contra dengue e zika. E ainda contra o citomegalovírus, o vírus do herpes e o parasita da toxoplasmose – agentes infecciosos que podem causar microcefalia e integram a lista dos Storch (acrônimo de sífilis, toxoplasmose, rubéola, citomegalovirose e herpes).

Com o avanço da gestação, Zanotto e seus colaboradores notaram que a concentração de anticorpos contra *Toxoplasma gondii* alcançou níveis de uma infecção recente. Os pesquisadores não sabem se a elevação representou uma reação do organismo materno ao ressurgimento dos parasitas, que pode ocorrer

com a queda da imunidade, ou à proliferação de células produtoras de anticorpos (expansão policlonal) contra *Toxoplasma*. Mas imaginam que não tenha sido um bom sinal. “Podem ter ocorrido lesões na placenta, tornando mais fácil para o zika invadir os tecidos do feto”, supõe Zanotto.

#### OUTRAS INFECÇÕES

O caso de Santos reforça a suspeita de que a ocorrência de outras infecções ajude a explicar a concentração de microcefalia em algumas regiões do país e entre as pessoas mais pobres. A toxoplasmose parece ser uma delas. Entre 13 fatores de risco comuns na gestação, ela foi o único que aumentou a probabilidade de microcefalia causada por zika, segundo estudo publicado no *Bulletin of the World Health Organization*. Estima-se que, em certas regiões do país, até 70% da população já tenha tido contato com o parasita. “Recentemente um ministério informou que 77% dos casos de microcefalia no Nordeste ocorrem em famílias com o IDH [índice de desenvolvimento humano] mais baixo”, conta Zanotto. “Essas pessoas estão mais suscetíveis a esses agentes infecciosos.”

A dengue também preocupa. Calcula-se que de 50% a 80% dos brasileiros já tenham sido infectados pelo vírus e tenham anticorpos contra dengue. Um estudo norte-americano indica que os anticorpos contra a dengue aumentam em até 200 vezes a infectividade do zika.

“Todo esse contexto não pode ser desprezado”, afirma Zanotto, que planeja testar para os agentes Storch os casos de microcefalia a que tem acesso. “A mãe que vive em Santos mora em uma região de IDH baixo”, conta. E explica: “Só saberemos se esses fatores exercem uma influência real à medida que compararmos a ocorrência de manifestações congênitas nos filhos de mães infectadas e com diferentes IDHs”. ■

#### Projetos

1. O papel do eixo triptofano-kinureninas na regulação da resposta imune através de receptores de glutamato tipo NMDA na encefalomielite experimental autoimune e na lesão por isquemia e reperfusão cerebral (nº2011/18703-2); **Modalidade** Programa Jovens Pesquisadores; **Pesquisador responsável** Jean Pierre Schatzmann Peron (ICB-USP); **Investimento** R\$ 1.077.384,82.
2. Abordagem sistêmica no estudo da permissividade do *Anticarsia gemmatilis* múltiplo nucleopoliedrovírus (AgMNPV) (nº2014/17766-9); **Modalidade** Auxílio à Pesquisa – Regular; **Pesquisador responsável** Paolo Marinho Zanotto (ICB-USP); **Investimento** R\$ 500.009,45.
3. Desenvolvimento de um teste preditivo para medicação bem-sucedida e compreensão das bases moleculares da esquizofrenia através da proteômica (nº2013/08711-3); **Modalidade** Programa Jovens Pesquisadores; **Pesquisador responsável** Daniel Martins de Souza (IB-Unicamp); **Investimento** R\$ 1.379.511,67.

#### Artigos científicos

- CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**. On-line. 11 mai. 2016.
- GARCEZ, P. P. *et al.* Combined proteome and transcriptome analyses reveal that Zika virus circulating in Brazil alters cell cycle and neurogenic programs in human neurospheres. **PeerJ Preprints**. 9 mai. 2016.
- HANAOKA, M. M. *et al.* A zika virus-associated microcephaly case with background exposure to Storch agents. **bioRxiv**. 10 mai. 2016.