

ESTUDOS EM INFECÇÕES EXPERIMENTAIS: ARBOVIROSES

Data de aceite: 03/07/2023

Mônica da Silva Nogueira

Centro de Experimentação Animal,
Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0009-0006-5793-3743

Yuli Rodrigues Maia de Souza

Laboratório de Medicina Experimental e
Saúde, Instituto Oswaldo Cruz, Fundação
Oswaldo Cruz,
Rio de Janeiro/RJ
ORCID 0000-0002-6202-1961

C57BL/6 possuem uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th1 e os camundongos BALB/c possuem uma resposta imunológica predominantemente do tipo Th2 (MACIEL *et al.*, 2015). Em relação à utilização desse modelo para o estudo de arboviroses, eventualmente é encontrada uma limitação devido à resistência de camundongos imunocompetentes, pois esses vírus, por vezes, são incapazes de transpor a barreira imunológica inata desses organismos. Ainda assim, é possível explorar a infecção por arbovírus em camundongos imunocompetentes utilizando-se diferentes vias de inoculação ou, ainda, em animais jovens, nos quais o sistema imunológico ainda não é capaz de abortar a infecção. Quando essas abordagens não são suficientes, uma alternativa envolve a utilização de camundongos imunodeprimidos deficientes para o receptor de interferon do tipo I, tal como o A129, e dos tipos I e II, tal como o AG129. Abordaremos, aqui, características e particularidades do uso de camundongos em infecções com o vírus Zika, com o vírus

1 | INTRODUÇÃO

Os camundongos são modelos animais bastante utilizados na pesquisa científica, entre outros fatores, devido ao seu baixo custo de aquisição e manutenção e pela maior facilidade de manejo.

Na literatura, são descritos estudos com arbovírus que utilizam camundongos heterogênicos, como o Swiss Webster, ou os isogênicos, como o C57BL/6 e o BALB/c. Esses últimos têm aplicabilidade interessante, pois diferem em seus padrões de resposta imunológica. Os camundongos

da Febre amarela selvagem e vacinal e com o vírus da Dengue.

2 | ARBOVÍRUS E ENSAIOS EXPERIMENTAIS

O vírus Zika (ZKV), o vírus da dengue (DENV) e o vírus da febre amarela são membros da família Flaviviridae, do gênero Flavivirus. A disseminação global e as complicações infecciosas os tornaram flavivírus de grande interesse em saúde pública. Existem pelo menos quatro DENV intimamente relacionados, mas sorologicamente distintos, designados como os sorotipos DENV 1 a 4. Existe proteção cruzada transitória e fraca entre os quatro sorotipos de DENV, de modo que indivíduos que vivem em uma área onde o DENV é endêmico podem ser infectados até quatro vezes. O ZKV e o DENV se espalharam pelos trópicos da África, Ásia, Pacífico e Américas com seus mosquitos vetores *Aedes aegypti* e *A. albopictus*. Tanto a infecção por ZKV quanto por DENV podem produzir um amplo espectro de doenças com muitas infecções assintomáticas ou subclínicas. O potencial do ZKV de causar anormalidades do sistema nervoso central fetal, restrição de crescimento e morte exigiu o teste de ZKV em gestantes potencialmente expostas (WILSON, *et al.*, 2017).

a. Vírus Zika

O vírus Zika, transmitido por mosquito (ZIKV), geralmente causa uma doença leve e autolimitada conhecida como febre Zika, que geralmente é acompanhada de erupção cutânea maculopapular, dor de cabeça e mialgia. Os camundongos deficientes em receptores α , β e γ de interferon (camundongos AG129) são altamente suscetíveis à infecção por ZIKV, agravando-se dentro de sete a oito dias, com rápida disseminação virêmica observada em órgãos viscerais e cérebro. Mas o ZIKV só foi associado a patologias graves no cérebro e músculo, apresentando esses resultados em todas as vias de desafio, idade dos animais e dose de inóculo. Dessa forma, representam um modelo de camundongo para ZIKV que não depende da adaptação do ZIKV à passagem intracerebral em camundongos (ALIOTA *et al.*, 2016).

Camundongos adultos imunocompetentes não são bons modelos experimentais para o vírus Zika, pois o ZIKV, quando inoculado pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea, não consegue suprimir de forma eficiente a via de sinalização STAT2 dependente de interferon, sendo, então, esse animal resistente à infecção por ZIKV nessas condições (GORMAN *et al.*, 2018). A alternativa que cinge o uso de camundongos em estudos para infecção do vírus Zika envolve a inoculação do vírus em camundongos neonatos competentes, a inoculação do ZIKV pela via cerebral de camundongos adultos imunocompetentes ou, ainda, a utilização de camundongos imunossuprimidos, como o A129 e o AG129. Camundongos imunocompetentes neonatos inoculados pela via intraperitoneal ou subcutânea desenvolvem ataxia, tremores, convulsões e quadro

de encefalite, por vezes acompanhado de morte. A inoculação do ZIKV no cérebro de camundongos imunocompetentes adultos leva a uma infecção fatal com acometimento do sistema nervoso. Em camundongos imunossuprimidos inoculados pelas vias subcutânea, intraperitoneal e intradérmica, observam-se perda de peso, postura curvada, tremores e acometimento do sistema nervoso central. Os camundongos AG129 são mais suscetíveis à morte pela infecção do ZIKV quando comparados aos A129 (MORRISON; DIAMOND, 2017).

Os camundongos devem ser pesados e monitorados diariamente quanto aos sinais da doença e deve-se realizar o ponto final humanitário quando os camundongos perderem 20% de seu peso corporal (JOHNSON *et al.*, 2020).

b. Vírus da Febre amarela

Assim como observado com o vírus Zika, camundongos adultos imunocompetentes heterogênicos ou isogênicos não são susceptíveis a infecção pelo vírus selvagem (VFA) ou vacinal (VFA-17D) pelas vias intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea. Para proceder com quaisquer investigações clínicas com camundongos jovens e adultos, é necessário valer-se de vias de inoculação em que as partículas virais acessem diretamente o sistema nervoso central, ou utilizar camundongos neonatos por qualquer via de inoculação, ou, ainda, considerar a utilização de camundongos imunossuprimidos.

Quando se utiliza uma via onde as partículas virais vacinais tenham acesso direto ao sistema nervoso central, como a inoculação intracerebral, os animais, ainda que imunocompetentes, desenvolvem a forma neurotrópica da febre amarela com altíssima taxa de mortalidade entre 7-8 dias após a inoculação (ERICKSON; PFEIFFER, 2015). Em se tratando da infecção de camundongos neonatos, observa-se uma evolução fatal do quadro, completamente diferente da resistência encontrada em animais adultos. Camundongos adultos deficientes para o receptor de interferons (A129 e AG129) têm grande valia quando há interesse que os animais desenvolvam a forma viscerotrópica da febre amarela, ou, ainda, para avaliar os efeitos da infecção em organismos imunodeprimidos (especialmente com o vírus vacinal), ou, ainda, quando é necessário utilizar as vias de inoculação às quais os camundongos competentes são resistentes (intramuscular, intraperitoneal, intravenosa ou subcutânea) (MEIER *et al.*, 2009).

A forma neurotrópica da febre amarela em camundongos é caracterizada por uma encefalite aguda na qual os animais apresentam sinais de dor, como postura curvada, pelos eriçados, respiração irregular e letargia; também apresentam sinais que refletem os danos neurológicos, tais como a perda da força das patas traseiras, o que pode evoluir para uma paralisia parcial ou total, diminuição ou perda da reatividade das forças de preensão e suspensão pela cauda e, ainda, descarga ocular (ERICKSON; PFEIFFER, 2015). A forma viscerotrópica nesses animais caracteriza-se pelo acometimento do fígado, baço

e hemorragia intestinal. Os sinais clínicos iniciam-se entre 3 e 4 dias após a inoculação e em parte assemelham-se aos sinais presentes na forma neurotrópica: postura curvada, pelos eriçados, respiração irregular e letargia. A morte dos animais também ocorre entre 7-8 dias após a inoculação. Em ambos os quadros de desenvolvimento da febre amarela, neurotrópica e viscerotrópica, a perda de peso está presente como consequência do quadro moribundo em que o animal se situa (MEIER *et al.*, 2009).

c. Vírus da Dengue

Diferente dos arbovírus apresentados até aqui, o vírus da Dengue é capaz de causar a infecção em camundongos adultos imunocompetentes pela via intraperitoneal. Os animais são virêmicos e apresentam os sinais clínicos da Dengue, como trombocitopenia, hemorragia do baço, dano hepático e aumento da produção de interferon (YAUCH; SHRESTA, 2008).

A dengue é uma doença viral sistêmica aguda que representa um transtorno público crescente, atualmente considerado como a doença mais relevante transmitida por artrópodes. O vírus, concentrado em regiões tropicais e subtropicais do mundo, é transmitido principalmente por mosquitos *Aedes*, que colocam em risco de infecção aproximadamente metade da população mundial. As infecções podem ser oligossintomáticas ou resultar em uma doença leve semelhante à gripe. Além disso, complicações da dengue afetando órgãos e sistemas específicos, como cérebro, nervos periféricos, fígado, pulmão e coração, foram recentemente relatadas. Como não existem alternativas antivirais eficazes ou uma vacina disponível para controlar a infecção pelo vírus da dengue, atualmente, as contramedidas dependem basicamente do controle vetorial, de programas educativos e tratamentos sintomáticos. (OLIVEIRA, E. R. A., *et al.*, 2016).

3 | PONTO FINAL HUMANITÁRIO

Para que seja estabelecido o ponto final humanitário, é necessário que seja considerado um equilíbrio entre alcançar o objetivo científico e poupar o animal de sofrimento.

Deve-se considerar que existe uma variabilidade relacionada à observação do avaliador, bem como na interpretação dessas observações. Os sinais clínicos fornecem um julgamento objetivo da dor e angústia do animal, no entanto, para que esses sinais sejam fidedignos, os observadores devem ter bons padrões de observação e conhecimento do que é considerado normal para aquela espécie animal e linhagem. Uma boa estratégia de avaliação é envolver todos aqueles que atuam no trabalho de pesquisa com animais, porque cada um trará um foco diferente: os tratadores, com sua experiência prática; os veterinários, com conhecimento clínico; e os pesquisadores, com o conhecimento dos potenciais efeitos de seus procedimentos científicos. Recentemente, o esquema de pontuação para animais

foi consideravelmente reforçado, tornando-se mais rigoroso e com menos margem para variações de interpretações dos observadores. A contribuição do pesquisador é essencial para determinar o estágio inicial em que o objetivo científico foi alcançado. O uso de planilhas de pontuação fornece informações cronologicamente organizadas.

Os efeitos adversos experimentados pelos animais durante a pesquisa vão além da dor e podem incluir desconforto devido a alguns fatores, como, por exemplo, a separação dos grupos e o isolamento. No entanto, antes que quaisquer desses sinais possam ser observados, é preciso ser capaz de reconhecer o bem-estar dos animais (MORTON, 2020).

4 | PLANILHA DE ESCORE CORPORAL

Não é possível ter uma lista única e generalizada para todos os sinais clínicos que ocorrerão em todos os experimentos. As planilhas de pontuação devem ser elaboradas especificamente para cada procedimento experimental.

Um estudo piloto deve ser realizado para a melhor definição do ponto final humanitário. Sendo assim, o ponto final já estará definido quando os experimentos começarem. Os sinais observáveis serão o peso corporal e a aparência do animal, como a pelagem e a postura.

Abaixo, sugerimos um checklist que pode ser usado e adaptado para cada experimento ou modelo:

Acompanhamento clínico/comportamental*			
Avaliador: _____		Horário (turno): _____	
Data: ___/___/___	Animal ___	Animal ___	Animal ___
Dia pós-infecção/desafio	Caixa ___	Caixa ___	Caixa ___
Perda de peso de 5 a 10%	() 3	() 3	() 3
Perda de peso de 10 a 15%	() 6	() 6	() 6
Perda de peso de 15 a 20%	() 9	() 9	() 9
Perda de peso ≥ 20%	() 12	() 12	() 12
Temperatura normal	() 0	() 0	() 0
Hipertermia	() 6	() 6	() 6
Hipotermia	() 9	() 9	() 9
Respiração normal	() 0	() 0	() 0
Respiração aumentada	() 6	() 6	() 6
Respiração abdominal	() 12	() 12	() 12
Postura corporal			
Normal	() 0	() 0	() 0
Curvamento leve	() 6	() 6	() 6
Curvamento moderado	() 9	() 9	() 9
Curvamento grave	() 12	() 12	() 12
Olhos abertos > 75%	() 0	() 0	() 0
Olhos com abertura de 50 a 75%	() 6	() 6	() 6
Olhos com abertura de 25 a 50%	() 9	() 9	() 9
Olhos c/ abertura < 25%	() 12	() 12	() 12

Mobilidade - ativo	() 0	() 0	() 0
Mobilidade reduzida	() 3	() 3	() 3
Relutante em se movimentar	() 3	() 3	() 3
Ataxia/marcha vacilante	() 6	() 6	() 6
Incapaz de se movimentar	() 12	() 12	() 12
Pelagem normal (lisa e brilhante)	() 0	() 0	() 0
Higiene Reduzida	() 3	() 3	() 3
Piloereção discreta	() 3	() 3	() 3
Piloereção notória	() 9	() 9	() 9
Teste de suspensão pela cauda	() 0	() 0	() 0
Reativo	() 6	() 6	() 6
Pouco reativo	() 9	() 9	() 9
Não reativo			
Teste de força de preensão dos membros traseiros			
Reativo	() 0	() 0	() 0
Pouco reativo	() 6	() 6	() 6
Não reativo	() 9	() 9	() 9
Paralisia dos membros traseiros			
Unilateral	() 6	() 6	() 6
Bilateral	() 9	() 9	() 9
ESCORE TOTAL			
- Observação 01 vez ao dia com escore até 24			
- Observação 02 vezes ao dia com escore \geq 24			
- EUTANÁSIA – escore total \geq 36			
- EUTANÁSIA – qualquer item sozinho pontuar 12			
* Sistema de pontuação para a finalização humanitária nas pesquisas com arbovirose experimental do Centro de Experimentação Animal do Instituto Oswaldo Cruz/Fiocruz. Tabela adaptada do Sistema de Pontuação de Intervenção Murina (MISS 3) de Koch <i>et al.</i> (2016) e Nunamaker (2013).			
Considerações para a avaliação clínica dos animais:			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Marque um (x) em cada critério observado e, ao final, realize o somatório das pontuações. 2. Recomendamos que 1 (um) ou no máximo 2 (dois) pesquisadores realizem a avaliação dos animais durante o experimento. 3. Os animais devem ser avaliados diariamente após o procedimento de desafio/infecção. 4. A frequência de monitoramento será intensificada de acordo com a pontuação de avaliação clínica. 5. Animais com score total de 36 ou mais devem ser submetidos à EUTANÁSIA. 6. Animais com qualquer item de escore 12 também devem ser submetidos à EUTANÁSIA, independente do escore total. 			
a. Instruções gerais:			
<ol style="list-style-type: none"> 1. Inspeção visual deve ser realizada 01 (uma) vez ao dia. 2. Peso e temperatura devem ser registrados 01 (uma) vez ao dia. 3. Testes de força e de suspensão pela cauda devem ser realizados 01 (uma) vez ao dia. 4. Aumento da inspeção visual para 02 (duas) vezes ao dia quando o escore total ultrapassar 24 ou ocorrer 10 % de perda de peso corporal basal em 24 horas. 			

b. Avaliação do Peso:

1. O peso é aferido em balança analítica.
2. O percentual de perda de peso será relacionado ao peso no tempo zero, isto é, peso avaliado momento antes do procedimento.

c. Aferição da temperatura

1. A temperatura é aferida através de termômetro infravermelho próprio para animais na região ventral. Caso não possua um termômetro próprio para animais, desconsidere esse parâmetro.
2. A temperatura normal de um camundongo varia entre 36.5 °C a 38 °C.
3. A HIPERTERMIA pode ocorrer nas primeiras 24 horas após o procedimento e será considerada em até 3 °C acima da temperatura normal. Acima de ≥ 3 °C, o animal será submetido à EUTANÁSIA.
4. A HIPOTERMIA é considerada crítica nos animais e temperaturas abaixo de 35 °C serão consideradas como um limite para a EUTANÁSIA.

d. Teste de suspensão pela cauda

1. Para o teste, os animais são suspensos pela base da cauda por um período curto (5 segundos).
2. O teste de suspensão pela cauda demonstra a capacidade do animal em tentar retornar ao estado normal, com a tentativa voltar a cabeça em direção à cauda suspensa.
3. Animais com danos psicotores ficam menos reativos à suspensão da cauda.

e. Teste de força de preensão

1. O teste consiste em suspender o animal pela base da cauda e colocar o dedo indicador do avaliador nas patas TRASEIRAS a fim de estimular o animal a segurar a grade.
2. Para este protocolo, o teste de força é realizado para averiguar a capacidade das patas TRASEIRAS em realizar o movimento de preensão.

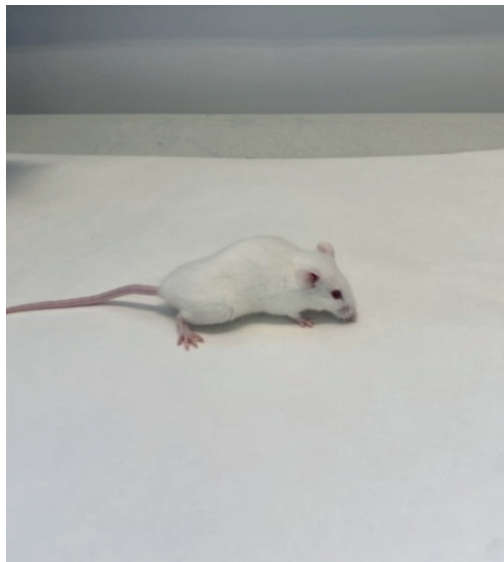


Figura 1: Camundongo com dorso moderadamente arqueado

Fonte: Monica Nogueira, IOC/Fiocruz, 2021.



Figura 2: Camundongo com dorso gravemente arqueado
Fonte: Monica Nogueira, IOC/Fiocruz, 2021.

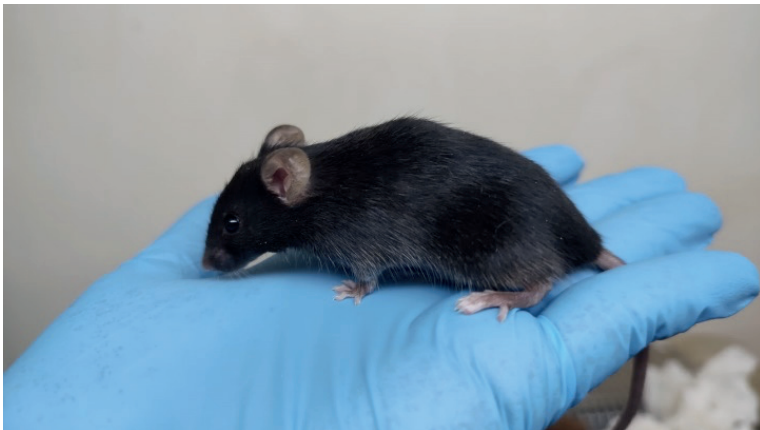


Figura 3: Camundongo com dorso levemente arqueado
Fonte: Yuli Maia, IOC/Fiocruz, 2022.

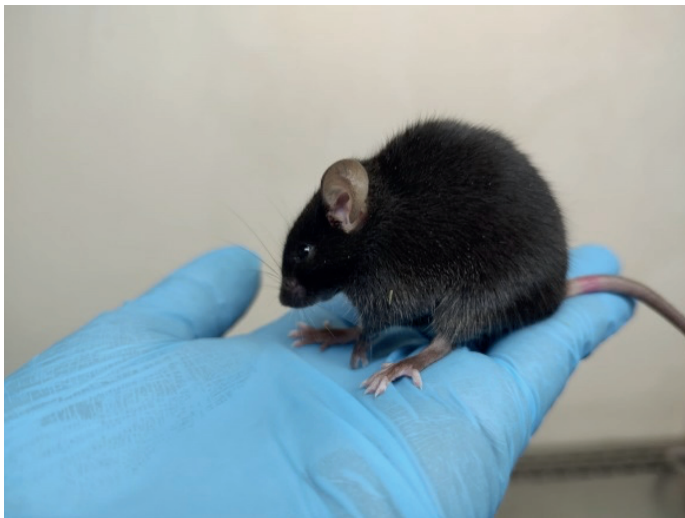


Figura 4: Camundongo com dorso gravemente arqueado

Fonte: Yuli Maia, IOC/Fiocruz, 2022.

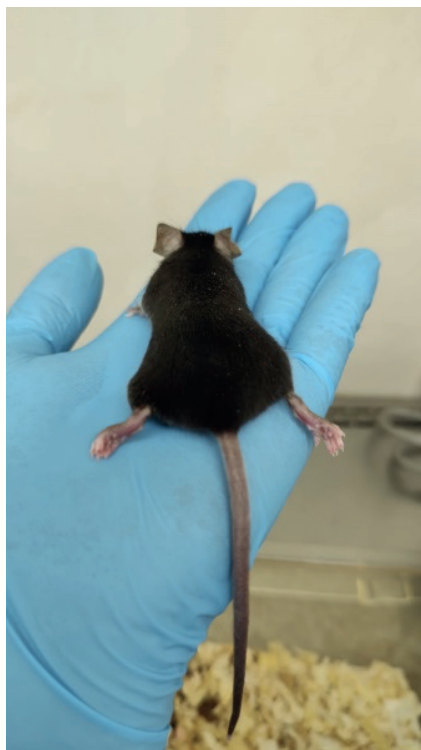


Figura 5: Camundongo com paralisia de membros posteriores

Fonte: Yuli Maia, IOC/Fiocruz, 2022.

REFERÊNCIAS

ALIOTA, Matthew T. *et al.* Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 4, p. e0004682, 2016.

ASHALL, V.; MILLAR, K. Endpoint matrix: a conceptual tool to promote consideration of the multiple dimensions of humane endpoints. **ALTEX - Alternatives to animal experimentation**, [S. l.], v. 31, n. 2, p. 209–213, 2014.

ERICKSON, A. K.; PFEIFFER, J. K. Spectrum of disease outcomes in mice infected with YFV-17D. **The Journal of General Virology**, v. 96, n. Pt 6, p. 1339, 27 jan. 2015. Disponível em: </pmc/articles/PMC4635484/>. Acesso em: 8 jun. 2022.

GORMAN, M. J. *et al.* An immunocompetent mouse model of Zika virus infection. **Cell host & microbe**, v. 23, n. 5, p. 672, 5 maio 2018. Disponível em: </pmc/articles/PMC5953559/>. Acesso em: 9 ago. 2022.

JOHNSON, Katherine E. E. *et al.* Mapping the evolutionary landscape of Zika virus infection in immunocompromised mice. **Virus evolution**, v. 6, n. 2, p. 092, 2020.

KOCH, A. *et al.* Establishment of Early Endpoints in Mouse Total-Body Irradiation Model. **PLoS ONE** 11, e0161079 (2016).

MACIEL, M. *et al.* A DNA Vaccine against Yellow Fever Virus: Development and Evaluation. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 4, 13 abr. 2015.

MEIER, K. C. *et al.* A Mouse Model for Studying Viscerotropic Disease Caused by Yellow Fever Virus Infection. **PLoS Pathogens**, v. 5, n. 10, p. e1000614, 9 out. 2009. Disponível em: <https://dx.plos.org/10.1371/journal.ppat.1000614>. Acesso em: 22 maio 2020.

MORRISON, T. E.; DIAMOND, M. S. Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. **Journal of virology**, v. 91, n. 8, 15 abr. 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28148798/>. Acesso em: 9 ago. 2022.

MORTON, David B. A systematic approach for establishing humane endpoints. **Ilar Journal**, v. 41, n. 2, p. 80-86, 2000.

NUNAMAKER, E. A.; ARTWOHL, J. E.; ANDERSON, R. J. & FORTMAN, J. D. Endpoint Refinement for Total Body Irradiation of C57BL/6 Mice. **Comparative Medicine** 63, 7 (2013).

OLIVEIRA, E. R. A. *et al.* Peripheral effects induced in BALB/c mice infected with DENV by the intracerebral route. **Virology**, 2016, 489: 95-107.

PAIXÃO, R. L. **Experimentação Animal: razões e emoções para uma ética**. Rio de Janeiro, 2001. 151 f. Tese (Doutorado em Saúde Pública) - Escola Nacional de Saúde Pública, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, 2001.

WILSON, Heather L. *et al.* Neutralization assay for Zika and dengue viruses by use of real-time-PCR-based endpoint assessment. **Journal of clinical microbiology**, v. 55, n. 10, p. 3104-3112, 2017.

YAUCH, L. E.; SHRESTA, S. Mouse models of dengue virus infection and disease. **Antiviral research**, v. 80, n. 2, p. 87, nov. 2008. Disponível em: </pmc/articles/PMC3048811/>. Acesso em: 9 ago. 2022.