

**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA MÉDICA**

**Avaliação da transmissão vertical do vírus Mayaro em modelo  
gestacional murino**

**Angélica Silva**

**Orientador: Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**

**Ribeirão Preto**

**2024**

ANGÉLICA SILVA

**Avaliação da transmissão vertical do vírus Mayaro em modelo  
gestacional murino**

**Versão corrigida**

Tese de doutorado apresentada ao curso de Pós-Graduação em Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto para obtenção de título de Doutora em Ciências.

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

**Ribeirão Preto**

**2024**

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTES  
TRABALHO POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA  
FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO  
SERVIÇO DE DOCUMENTAÇÃO  
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Silva, Angélica

Avaliação da transmissão vertical do vírus Mayaro em modelo gestacional murino.  
63f.: il.; 30cm

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação Clínica Médica, Faculdade de Medicina de  
Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

Versão original

- |           |                              |              |             |
|-----------|------------------------------|--------------|-------------|
| 1. Mayaro | 2. Alfavírus                 | 3. Arbovírus | 4. Gestação |
| 5. Vírus  | 6. Infecção transplacentária |              |             |

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Angélica Silva

Título: Avaliação da transmissão vertical do vírus Mayaro em modelo gestacional murino.

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação Clínica Médica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto - Universidade de São Paulo, para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2024.

### Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Instituição: Universidade Federal de São Paulo

Prof (a) Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof (a) Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

Prof (a) Dr (a). \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_

Julgamento \_\_\_\_\_

## **REFERÊNCIA AO APOIO RECEBIDO**

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

## DEDICATÓRIA

Dedico aos meus pais, que inúmeras vezes abdicaram da própria felicidade pela minha, que sempre estiveram ao meu lado acreditando e me apoiando, não mediram esforços para que eu pudesse alcançar todos os meus sonhos, que me ensinaram que nossas escolhas nem sempre são fáceis, mas que com esforço, integridade de caráter e fé tudo é possível. A vocês dedico a minha vida! Dedico também ao meu irmão e minhas sobrinhas que são os amores da minha vida e se busco meu melhor sempre é por vocês. Minha família, minha base e minha vida.

## **AGRADECIMENTOS**

À Deus por sempre estar ao meu lado mesmo nos momentos que menos mereci, me dando forças para nunca desistir.

Aos meus pais Antônio e Marta, ao meu irmão Luís Paulo e sobrinhas Elisa e Luísa, pelo apoio, carinho, atenção, paciência em toda essa jornada, sempre acreditando, sendo minha base e porto seguro, amo muito vocês.

Aos meus tios amados Vilma e Eduardo pelo carinho e apoio, a família é quem nos ama e nos quer bem, Deus me deu os melhores, amo vocês.

Ao meu orientador prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo por ter me apoiado, orientado, pelo aprendizado passado, pela paciência e atenção, muito obrigada, fez grande diferença na minha formação acadêmica, profissional e pessoal.

Aos meus queridos colegas de laboratório Carla, Leonardo, Victória, Rafael, Felipe, Renan, Esteban e Danilo, pelos momentos compartilhados, auxílio acadêmico e amizade, obrigada por tudo.

Aos funcionários do CPV Sueli, Pity, Adriana, Leila e Andreia. E a especialista de laboratório Soraya, por sempre me dar suporte no projeto, ajudar, dar atenção e aconselhar, foi fundamental no decorrer do meu trabalho.

Ao programa de Clínica Médica – FMRP/USP por ter acreditado e me auxiliado todas as vezes em que precisei. Agradeço também ao secretário Emerson, por todo trabalho e ajuda nestes anos.

Aos órgãos de financiamento do meu trabalho CAPES e FAPESP, sem o apoio financeiro não seria possível desenvolver meu trabalho, muito obrigada.

## RESUMO

SILVA, A. **Avaliação da transmissão vertical do vírus Mayaro em modelo gestacional murino.** Tese de Doutorado. Programa de Pós-graduação em Clínica Médica – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

O *Alphavirus* Mayaro (MAYV) é um arbovírus conhecido como causador de doença febril aguda humana, que vem emergindo no Brasil com potencial para ser causador de grave problema de saúde pública. Sabendo que alguns *Alphavirus* são causadores de doença grave no recém-nascido por transmissão vertical, decidimos estudar o vírus Mayaro. Avaliamos a infecção transplacentária causada por MAYV em camundongos fêmeas C57/BL6j. Assim, analisamos a infecção por MAYV em diversos períodos de gestação dos camundongos fêmeas e suas possíveis implicações. Buscamos identificar a infecção por MAYV em placentas, cérebro e outros órgãos de mães infectadas e seus fetos. Para tanto, foram analisados 8 grupos de camundongos fêmeas prenhes que foram infectadas com altos teores de MAYV ( $10^7$  UFP/100 $\mu$ L) em diferentes fases gestacionais. Placentas, cérebros e macerados de órgãos fetais e órgãos maternos que foram analisados por RTq-PCR amplificando uma região do gene 5' UTR e NSP1 do MAYV. Foi também, analisado a infecção perinatal e as manifestações clínicas em animais recém-nascidos de mães infectadas por MAYV. Os resultados mostraram que o modelo experimental de infecção congênita por vírus Mayaro em camundongos é viável e pode ser reproduzido em estudos com outros vírus. O vírus Mayaro é transmitido por via transplacentária em camundongos C57BL/6j causando infecções congênitas graves. O vírus Mayaro infecta e por via transplacentária acomete os fetos murinos em diferentes fases da gestação.

**Palavras-chave:** Mayaro. Vírus. Transmissão vertical. Gestação. Alfavírus

## ABSTRAT

SILVA, A. Evaluation of the vertical transmission capacity of Mayaro virus in a murine gestational model. Doctoral Thesis. Graduate Program in Clinical Medicine – Faculty of Medicine of Ribeirão Preto – University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2024.

The Alphavirus Mayaro (MAYV) is an arbovirus known to cause acute febrile human disease, which has been emerging in Brazil with the potential to cause a serious public health problem. Knowing that some Alphaviruses are known to cause severe disease in newborns by vertical transmission, we decided to study the Mayaro virus. We evaluated the transplacental infection caused by MAYV in C57/BL6j mice. Thus, we analyzed the MAYV infection in different periods of gestation of the mice and its possible implications. We sought to identify MAYV infection in placentas, brains, and other organs of infected mothers and their fetuses. To this end, 8 groups of pregnant mice were infected with high titers of MAYV (10<sup>7</sup> PFU/100µL) at different gestational stages. Placentas, brains, and macerates of fetal and maternal organs were collected and analyzed by RTq-PCR amplifying a region of the 5' UTR and NSP1 genes of MAYV. The perinatal infection and clinical manifestations in newborn animals from MAYV-infected mothers were also analyzed. The results showed that the experimental model of congenital infection by Mayaro virus in mice is viable and can be reproduced in studies with other viruses. The Mayaro virus is transmitted transplacentally in C57BL/6j mice causing severe congenital infections. The Mayaro virus infects and transplacentally affects murine fetuses at different stages of gestation.

**Keywords:** Mayaro. Virus. Vertical transmission. Gestation. *Alphavirus*.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>12</b>
1.1. Arboviroses.....	13
1.2. Gênero <i>Alphavirus</i> .....	13
1.3. O Vírus Mayaro.....	16
1.4. Aspectos epidemiológicos do MAYV .....	17
1.5. Transmissão vertical por Arbovírus .....	18
<b>2. JUSTIFICATIVA.....</b>	<b>20</b>
<b>3. OBJETIVOS.....</b>	<b>21</b>
3.1. Objetivo geral.....	21
3.2. Objetivos específicos.....	21
<b>4. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>22</b>
4.1. Obtenção de estoque viral.....	22
4.2. Modelo experimental e infecção.....	23
4.3. Confirmação de infecção viral.....	24
4.3.1. Extração de RNA e Transcriptase Reversa.....	25
4.3.2 Reação em cadeia da polimerase para MAYV em amostras de cPCR.....	25
4.3.3. Quantificação viral.....	26
4.3.4. Imunofluorescência.....	27
4.4. Análises de dados.....	28
<b>5. RESULTADOS.....</b>	<b>29</b>
5.1. Produção da semente viral, confirmação e padronizações.....	29
5.2. Teste por RT-qPCR MAYV das amostras dos grupos com infecção no início (E5.5) da gestação (G1, G2, G3 e G4).....	31
5.3. Teste por RT-qPCR MAYV das amostras dos grupos com infecção no período mediano (E10.5) da gestação (G5, G6 e G7).....	37
5.4. Avaliação por RT-qPCR MAYV das amostras do grupo G8 com infecção no período final da gestação (E15.5) .....	39
<b>6. DISCUSSÃO.....</b>	<b>44</b>
<b>7. CONCLUSÃO.....</b>	<b>51</b>
<b>8. REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>

## INTRODUÇÃO

Entre os vírus causadores de infecção em animais e seres humanos, cerca de 70% possuem material genético na forma de RNA, em comparação com os vírus que possuem DNA em sua composição. Esses vírus são mais propensos a mutações, o que lhes confere maior capacidade de adaptação e isto está relacionado a infecções em diferentes hospedeiros. É importante ressaltar que algumas mutações podem aumentar a transmissibilidades e a virulência desses patógenos representando um problema permanente para a saúde pública em todo o mundo, preocupada com novas epidemias e pandemias (DUARTE et al., 1994; VAN BLERKOM, 2003).

Os grupos de risco para as viroses humanas incluem idosos, crianças, gestantes, pessoas com doenças crônicas, profissionais da saúde, pessoas com sistema imunológico comprometido e aqueles que viajam frequentemente. Também, a infecção viral durante a gestação pode levar a doenças congênitas com graves problemas aos fetos e nascituros. Sabe-se que infecções em gestantes pelos vírus Zika e Chikungunya, podem resultar em síndromes congênitas nos bebês nascidos dessas mães, bem como complicações gestacionais, incluindo parto prematuro e natimortalidade. Além disso, já foram relatados problemas relacionados a síndromes congênitas com Vírus do Nilo Ocidental, Vírus da rubéola, Vírus da hepatite C, Vírus do herpes simples, entre outros (CDC, 2022). A partir da pandemia, o COVID-19, também, foi associado a complicações gestacionais graves (GOSDIN et al., 2022; NEELAM et al., 2023; NEWTON et al., 2022; OLSEN et al., 2022; RASMUSSEN; JAMIESON, 2022, 2022). Portanto, para minimizar riscos de infecções virais durante a gestação e suas possíveis consequências obstétricas indesejáveis, é fundamental conhecer sobre os mecanismos da transmissão vertical de diferentes viroses. Dessa forma, inclusive, será possível identificar vírus que representam uma ameaça e estabelecer medidas preventivas e terapêuticas adequadas para garantir uma gestação segura e saudável para a mãe e o bebê.

### 1.1. Arboviroses

Dentre os vírus que infectam seres humanos destacam-se os vírus zoonóticos e dentre eles os arbovírus, centenas de patógenos. O nome "arbovírus" é um acrônimo que significa "vírus transmitidos por artrópodes" ou, em inglês, *arthropod-borne viruses* (PINHEIRO, 1980). Estes artrópodes são principalmente mosquitos, moscas e carrapatos. Os arbovírus causam vários tipos de doença nos seres humanos e nos animais. Para serem transmitidos pela picada hematófaga dos artrópodes vetores, esses vírus se multiplicam e aumentam sua quantidade nas glândulas salivares dos animais o que facilita a transmissão (PEINADO et al., 2022). A maioria desses vírus são comuns em áreas tropicais e subtropicais e podem ser responsáveis por epidemias e surtos de doenças infecciosas. Dentre as doenças causadas por arbovírus estão o dengue, a febre amarela, a encefalite equina do Leste, a febre do Nilo Ocidental e a febre Chikungunya (WEAVER; REISEN, 2010).

Os arbovírus são mantidos em ciclos silvestres com a participação dos vetores e de animais-reservatório que costumam ser silvestres. Entretanto, arbovírus são transmitidos para os seres humanos e para os animais domésticos. Dessa forma, um hospedeiro humano ou animal doméstico infectado pode amplificar a virose propiciando que ela seja transmitida para outros hospedeiros humanos ou animais o que pode desencadear epidemias, principalmente quando o arbovírus passa a ser transmitido em um ciclo urbano. Por isso, o controle de mosquitos vetores urbanos, tornou-se uma das principais estratégias para prevenir a disseminação de vários arbovírus (YOUNG, 2018) .

### 1.2. Gênero *Alphavirus*

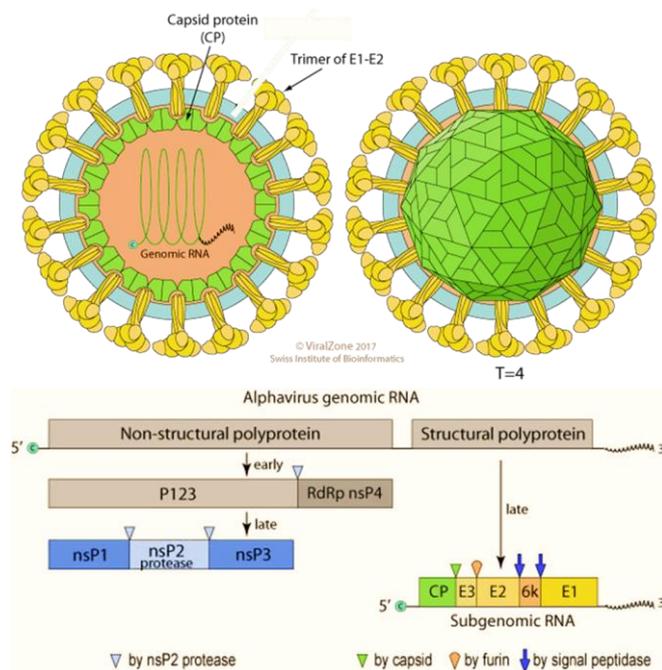
Os registros mais antigos relacionados aos *Alphavirus* datam dos séculos 18 e 19, quando ocorreram epidemias de encefalite em cavalos no nordeste dos Estados Unidos e surtos de artrite no Sudeste Asiático. O primeiro relato claro de uma encefalite equina epidêmica é de 1831, quando 75 cavalos morreram em Massachusetts (HANSON, 1957). Nos 100 anos seguintes, vários surtos locais de encefalite em cavalos foram observados

ao longo da costa atlântica dos Estados Unidos e na região dos Pampas na América do Sul (LANGSJOEN et al., 2023). No entanto, o primeiro *Alphavirus* a ser isolado foi o vírus da encefalite equina ocidental (WEEV), a partir de tecidos do sistema nervoso central (SNC) de 2 cavalos de Nova Jersey e Virginia (MEYER, 1931).

Os *Alphavirus*, segundo a atualização taxonômica em setembro de 2021, são um gênero pertencente à família *Togaviridae*. Os *Alphavirus* incluem 36 espécies, agrupadas em sete complexos antigênicos: o complexo Semliki Forest, o complexo do vírus da encefalite equina venezuelana (VEEV), o complexo do vírus da encefalite equina ocidental (WEEV), o complexo do vírus Sindbis (SINV), o complexo do vírus Chikungunya (CHIKV), o complexo do vírus Mayaro (MAYV) e o complexo do vírus Ross River (RRV). Esses complexos, mais recentemente, também, passaram a se basear nos genomas virais. Portanto, cada complexo é composto por uma ou mais espécies de *Alphavirus* que tem em comum similaridades genômicas, antigênicas e ecológicas (ICTV, 2023).

Os *Alphavirus* são icosaédricos e envelopados, com cerca de 65-70 nm de diâmetro. Seus genomas consistem de uma fita simples de RNA sentido positivo. O RNA possui duas regiões de leituras abertas (ORFs) separadas por uma região intergênica. A primeira ORF, possui dois terços do genoma viral e é responsável pela codificação de 4 proteínas não estruturais (nsP1-4). A segunda ORF, ocupa o outro terço desse genoma, e é responsável pela transcrição de uma poliproteína codificadora das proteínas estruturais do capsídeo (C) e do envelope (E): E1, E2, E3 e 6K (MOTA et al., 2015). A estrutura dos *Alphavirus* está exemplificada na **Figura 1**.

**FIGURA 1:** Representação genômica dos *Alphavirus*. Mostrando a partícula viral de formato esférico ou pleomórfico, constituída por um envoltório de origem lipoproteica e nucleocapsídeo icosaédrico composto pela sua respectiva proteína. Espículas na superfície viral são formadas por trímeros das proteínas E1 e E2.



**Fonte:** Adaptado pela autora. Representação genômica dos *Alphavirus*. Site [https://viralzone.expasy.org/625?outline=all\\_by\\_species](https://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species) (2023).

Os *Alphavirus* também são divididos em três grandes grupos com base, principalmente, no local de ocorrência e características biológicas: o Grupo I (conhecido como "New World" ou Novo Mundo), o Grupo II ("Old World" ou Velho Mundo) e o Grupo III. O Grupo I inclui as espécies americanas, como VEEV, EEEV e WEEV, que causam surtos de encefalite humana e animal. O Grupo II inclui os vírus encontrados na África, Europa e Ásia e aí estão CHIKV, RRV e SINV, vírus que causam doença artrítogênica em seres humanos. O Grupo III possui apenas uma espécie, o Salmon Panamá vírus, transmitido por carrapatos e endêmico em algumas regiões da América do Sul (LWANDE et al., 2015; STRAUSS; STRAUSS, 1994). Nestes grupos relacionados à localização geográfica faz exceção o vírus Mayaro (MAYV) que ocorre no Novo Mundo e causa doença artrítogênica em seres humanos (ASSUNCAO-MIRANDA; CRUZ-OLIVEIRA; DA POIAN, 2013).

### 1.3. O Vírus Mayaro

O vírus Mayaro foi isolado pela primeira vez em Trinidad e Tobago, em 1954, durante um surto de febre que afetou cerca de 60% da população local (ANDERSON et al., 1957) . Desde então, o vírus já foi identificado em vários países da América do Sul, Central e Caribe, incluindo o Brasil, Peru, Equador, Colômbia, Venezuela e Suriname (AUGUSTE et al., 2015; VASCONCELOS et al., 2001). MAYV é transmitido principalmente por mosquitos do gênero *Haemagogus*, mas também pode ser transmitido pelo mosquito *Aedes aegypti* em condições experimentais (VASCONCELOS et al., 2001). A maioria das infecções por MAYV costuma ser assintomática ou produz sintomas leves, que incluem febre, dor de cabeça e dor nas articulações. A febre do Mayaro é semelhante à do Chikungunya e do Dengue. Entretanto, em alguns casos, a infecção por MAYV pode evoluir com dor articular intensa (HOTEZ; MURRAY; BUEKENS, 2014; ZUCHI et al., 2014). Dentre os sinais e sintomas da Febre do Mayaro estão incluídos exantema, mialgias, calafrios, manifestações gastrointestinais e dor ocular (AGUILAR-LUIS et al., 2020).

Nos últimos anos MAYV tem despertado preocupação das autoridades de saúde como um vírus emergente, especialmente no Brasil. MAYV tem causado surtos em suas áreas endêmicas da Amazônia e Brasil central, mas o número de casos vem aumentando e se espalhando por novas áreas do país que incluem o Sudeste. Também o potencial de transmissão por *Aedes aegypti* um vetor antropofílico urbano disseminado em nossas cidades, alerta para a possibilidade de grandes epidemias (FIGUEIREDO; FIGUEIREDO, 2014). Além disso, estudos recentes têm demonstrado a ocorrência de casos de infecção por Mayaro em áreas anteriormente, consideradas livres do vírus, sugerindo que a distribuição geográfica do vírus pode ser maior do que se pensava anteriormente o que pode tornar-se um problema de saúde pública em um futuro próximo, imitando assim a evolução epidemiológica de outras arboviroses (ESPOSITO; FONSECA, 2017) .

#### 1.4. Aspectos epidemiológicos do MAYV

Os estudos epidemiológicos da infecção por MAYV são escassos e com poucos dados disponíveis. Boa parte do conhecimento epidemiológico foi adquirido após um surto entre os anos de 1978 e 1979 em Belterra, uma aldeia rural do estado do Pará, na região norte do Brasil, onde observou-se que aproximadamente 20% das mais de 4.000 pessoas residentes desta aldeia estavam infectadas e com uma proporção alta de doentes. Nesse surto, os principais sintomas relatados foram febre, dor de cabeça, mialgia, artralgia e rash cutâneo. Além disso, estudos sorológicos indicaram que a taxa de infecção na aldeia pode ter sido ainda maior, com até 50% da população apresentando anticorpos contra o MAYV. (FORSHEY et al., 2010; WEAVER; REISEN, 2010).

O diagnóstico de infecções por MAYV é subnotificado por: deficiências na Vigilância epidemiológica nas áreas endêmicas; confusão entre a sintomatologia produzida por este vírus com a de doenças causadas por outros patógenos como é o caso do dengue (FORSHEY et al., 2010; WEAVER; REISEN, 2010). Forshey e colaboradores, em 2010, usaram de um sistema de vigilância sindrômica por aproximadamente sete anos, que foi implementado em 13 locais, no Equador, Peru, Bolívia e Paraguai. Foram coletadas amostras séricas de pacientes febris de 20.880 participantes buscando por infecções virais por técnicas de imunofluorescência e RT-PCR. Os soros de fase aguda e convalescença foram testados por ELISA buscando por IgM específica para MAYV. O estudo mostrou que 1% das doenças febris semelhantes à dengue que ocorrem na região norte da América do Sul foram causadas por MAYV (FORSHEY et al., 2010).

Foram descritos surtos de MAYV no Peru (FORSHEY et al., 2010; HALSEY et al., 2013), Guiana Francesa (TALARMIN et al., 1998), Venezuela (MUÑOZ; NAVARRO, 2012; TORRES et al., 2004), Colômbia (GROUT; MORALES; VIDALES, 1961, 1961; SCHAEFFER et al., 1959), Equador (IZURIETA et al., 2009, 2011), Panamá (GALINDO et al., 1966; SEYMOUR; PERALTA; MONTGOMERY, 1983) e Bolívia (FIGUEIREDO et al., 1989; SCHAEFFER et al., 1959). Também, levantamentos sorológicos na Guatemala (MUÑOZ; NAVARRO, 2012) e México (NAVARRETE-ESPINOSA; GÓMEZ-DANTÉS, 2006) mostraram a existência de infecções por MAYV. No Brasil, infecções por MAYV tem ocorrido na região norte, nos Estados do Pará,

Amazonas e Tocantins (AZEVEDO et al., 2009; FIGUEIREDO et al., 2004; NUNES et al., 2009).

Mas a circulação do MAYV vem se ampliando e a presença do vírus tem sido relatada em vários estados do Centro-Oeste, incluindo os estados de Goiás, Mato Grosso e Mato Grosso do Sul (BATISTA et al., 2013; PAUVOLID-CORRÊA et al., 2015; ZUCHI et al., 2014). Recentemente, dados sorológicos em doadores de sangue assintomáticos da cidade de São Carlos, interior paulista, sugeriram a circulação do MAYV na região sudeste do Brasil (ROMEIRO et al., 2020).

A ampliação das áreas onde circula o MAYV evidenciam ser este um vírus emergente nas Américas. Relatos sobre viajantes que foram à bacia amazônica e apresentaram sintomas febris, posteriormente identificados como infecções pelo *Alphavirus* MAYV (HASSING et al., 2010; TESH et al., 1999; THEILACKER et al., 2013), preocupam sobre o risco de disseminação do MAYV para todos os continentes (SLEGERS et al., 2014).

## 1.5 Transmissão vertical por Arbovírus

Alguns arbovírus já foram encontrados produzindo transmissão vertical em seus vetores, incluindo o Vírus da Febre do Oeste do Nilo, Vírus do Nilo Oriental, Vírus da Dengue, Vírus do Zika, Vírus da Encefalite Japonesa e Vírus da Febre do Vale de Rift (AJAMMA et al., 2018; BERGREN et al., 2021; CIOTA et al., 2017; CRUZ-NOLASCO et al., 2015; DAHL et al., 2022; HONÓRIO et al., 2019; NAYAR; ROSEN; KNIGHT, 1986; NELMS et al., 2013). A transmissão vertical ocorre quando um vírus é transmitido de uma fêmea infectada para seus descendentes na oviposição. Essa forma de transmissão é um mecanismo de disseminação e manutenção de arbovírus no meio ambiente, e tem sido implicada no surgimento de novas linhagens virais (AGARWAL; PARIDA; DASH, 2017).

Quanto aos vertebrados e dentre eles os seres humanos, os arbovírus ao infectarem animais em gestação, podem provocar abortamentos ou seus fetos podem sofrer efeitos

teratogênicos. Isto ficou evidente durante a epidemia de ZIKV, entre 2015 e 2016, no nordeste brasileiro com os casos de microcefalia (CALVET et al., 2016; CAUCHEMEZ et al., 2016; HAMEL et al., 2015; LICHINCHI et al., 2016). Arbovírus emergentes podem se disseminar nos diversos continentes influenciados pelo clima, que pode provocar migração de vetores mosquitos e influenciar a competência vetorial dos mesmos bem como a sua transmissão vertical. (BHATT et al., 2013; DAHL et al., 2022; WEAVER; LECUIT, 2015; WEAVER; REISEN, 2010). Um estudo realizado no Vietnã com 20 gestantes com vírus do dengue mostrou que 18 (90%) tinham NS1 e eram infecções primárias, destas 4 (20%) tiveram partos prematuros e 1 (5%) gerou um natimorto. Todos os neonatos nascidos vivos receberam alta hospitalar sem intercorrências. (TIEN DAT et al., 2018).

Durante uma epidemia de CHIKV no sul do Oceano Índico, em 2005, observou-se a ocorrência de transmissão vertical num estudo com 160 gestantes. Destas 20,6% (nº33) apresentavam viremia por CHIKV no momento do parto, e provavelmente, como consequência, 16 neonatos desenvolveram sintomas típicos dias após o nascimento. Observou-se nesse estudo um risco de transmissão vertical perinatal do CHIKV de 48,5% (LENGLET et al., 2006). Após 2 anos, 51% das 33 crianças originalmente infectadas tiveram atraso no neurodesenvolvimento em comparação com apenas 15% nas 135 crianças não infectadas. Os autores concluíram que a infecção perinatal por CHIKV provocou atraso neurocognitivo nas crianças (GÉRARDIN et al., 2014).

Outros relatos de casos de CHIKV em gestantes mostram aborto espontâneo, infecção intrauterina, partos prematuros e doença neonatal (GÉRARDIN et al., 2014; LEMANT et al., 2008; LENGLET et al., 2006; SALOMÃO et al., 2021; VASANI et al., 2016).

Sabendo que as infecções em gestantes por *Alphavirus* podem provocar problemas maternos e fetais, apesar da ausência de referências a casos de teratogenia humana por *Alphavirus* MAYV, faz-se importante estudar sobre a sua possível transmissão vertical e anomalias fetais.

## 2 JUSTIFICATIVA

Considerando que infecções humanas por *Alphavirus* MAYV têm sido cada vez mais relatadas e muitos pesquisadores questionam se este vírus será, em breve, causador de epidemias no Brasil (ESPOSITO; FONSECA, 2017). Também, sabendo que *Alphavirus* têm sido descritos como causadores de doença fetal por transmissão vertical dentro do útero materno ou durante o nascimento (SALOMÃO et al., 2021; VASANI et al., 2016) e que neonatos sintomáticos podem desenvolver complicações neurológicas graves, incluindo convulsões e sangramento intracerebral que inclusive, podem levá-los à morte (GÉRARDIN et al., 2014). Decidimos estudar modelos murinos de transmissão vertical do MAYV o que acreditamos pode lançar luz sobre a fisiopatologia da infecção e permitir futuros tratamentos e candidatos a vacinas. Também, os estudos poderão permitir o desenvolvimento de medidas bloqueadoras da infecção transplacentária eliminando chances de efeitos teratogênicos nos neonatos.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo geral**

Avaliar a infecção e analisar a transmissão vertical do *Alphavirus* Mayaro em modelo murino durante a gestação.

#### **3.2. Objetivos específicos**

- Avaliar infecção transplacentária causada por MAYV em camundongos.
- Analisar a infecção por MAYV em diversos períodos de gestação das camundongos fêmeas e suas possíveis implicações.
- Identificar a infecção por MAYV em placentas, cérebro e outros órgãos de mães infectadas.
- Analisar a infecção perinatal e as manifestações clínicas em animais recém-nascidos de mães infectadas por MAYV.

## 4. MATERIAIS E MÉTODOS

Este projeto foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CPV-FMRP-USP) e aprovado pelo Comitê de Ética para uso de animais (CEUA), PROTOCOLO N°1191/2023 (ANEXO I).

### 4.1. Obtenção de estoque viral

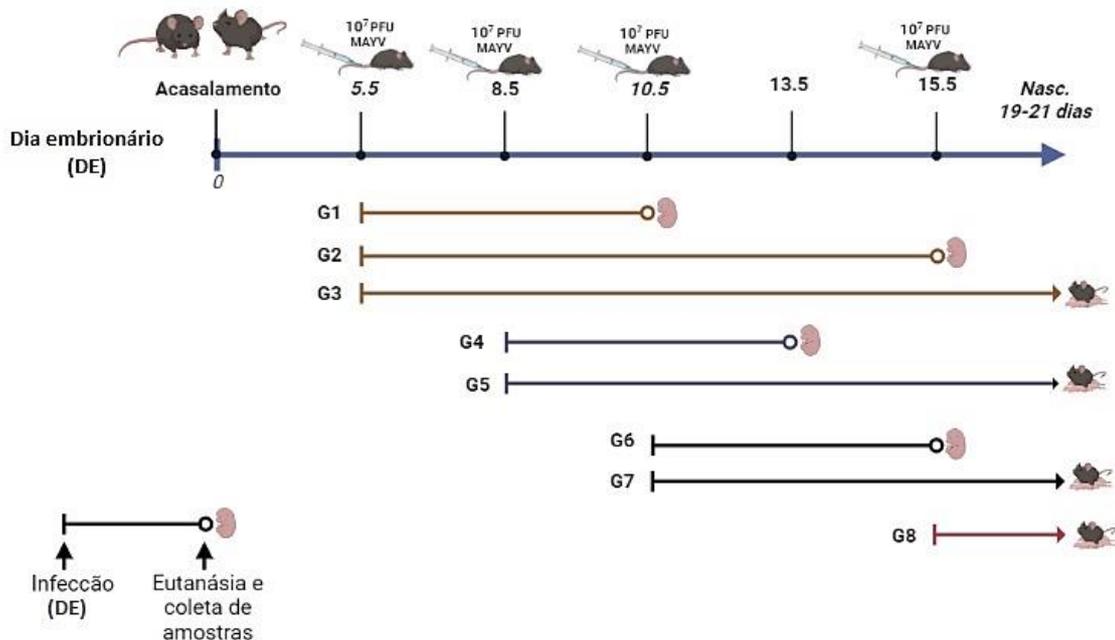
Foi utilizada semente viral MAYV cepa BeAr 20290, isolada do mosquito *Haemagogus* sp em 1960, fornecida pela virooteca do CPV-FMRP-USP. Os vírus foram propagados em monocamadas com 80% de confluência de células de *Aedes albopictus* C6/36 (ATCC – CRL-1660) em meio de cultura Leibovitz-15 (L-15- Vitrocell-Campinas) suplementado com 2% SFB, mantidas em estufa a 29°C e avaliadas quanto a presença de efeito citopático, como a formação de sincícios, grumos celulares e consequentemente, morte celular. Após apresentarem efeito citopático, alíquotas de sobrenadante viral foram alíquotadas e armazenadas em *freezer* -80°C, até a realização do estudo.

Para confirmar a infecção neste estoque viral, alíquotas do mesmo foram submetidas a RT-qPCR para pesquisa de fragmento genômico compatível com o MAYV (WAGGONER et al., 2018). Também, as amostras no estoque viral foram quantificadas quanto ao MAYV em unidades formadoras de placas (UFP) e imunofluorescência indireta.

## 4.2. Modelo experimental e infecção

Camundongos da linhagem C57BL/6J WT, 54 fêmeas e 10 machos, obtidos no Biotério Central da FMRP-USP, foram mantidos em instalações livres de patógenos específicos no Centro de Pesquisa em Virologia (CPV), sem restrição de ração e água. Os machos foram utilizados apenas até a cópula, sendo posteriormente eutanasiados com dose letal da associação anestésica de Xilazina (30mg/kg) e Cetamina (300mg/kg), como recomendado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal. Inicialmente, grupos com 4 fêmeas foram mantidos na mesma gaiola, por 10 dias, sem o contato com o macho para sincronizar o ciclo estral. Ao final deste período, a progressão do ciclo foi reestimulada alojando 2 fêmeas que iriam acasalar com 1 macho (mantido separado individualmente), previamente escolhido. Passados 3 dias, o macho foi colocado na mesma gaiola com as 2 fêmeas. Os animais foram observados diariamente. Após a confirmação do sucesso na cópula por visualização do tampão *plug* vaginal, considerava-se a fêmea prenha e no 0,5º dia embrionário. As fêmeas gestantes foram divididas em 8 grupos, para diferentes estudos sobre período de infecção. Estas fêmeas foram inoculadas com 100µL contendo 10<sup>7</sup> UFP do MAYV, pela via intravenosa, na veia caudal, nos dias embrionários (E): E5.5; E8.5; E10.5 e E15.5. Após eutanásia materna, fetos e placentas foram coletados nos dias E10.5; E13.5 e E15.5. Também, animais de cada período embrionário foram conservados para parto natural. Os animais foram mantidos por 90 dias e após este período coletou-se o sangue dos mesmos pela veia caudal. A eutanásia dos animais foi feita com a associação de anestésicos Cetamina (300mg/kg) e Xilazina (30mg/kg), em dose letal (BRASIL-CONCEA, 2018). Um grupo proveniente de cada infecção e segundo o dia embrionário, foi mantido até o parto natural, para avaliação perinatal e pós-natal. Após eutanásia dos animais, foram coletadas amostras dos órgãos maternos (baço, fígado, rim, pulmão, coração e cérebro) e dos órgãos fetais, que foram macerados, devido à dificuldade em separá-los. Também se coletaram cérebro fetal e placenta. Do grupo de animais que tiveram nascimento natural, foram coletados: soro e os órgão dos natimortos (macerados). As amostras, após identificação, foram armazenadas em *freezer* -80°C.

**FIGURA 2: Delineamento experimental.** Grupos de camundongos fêmeas evidenciando dias de infecção e de eutanásia para coleta de amostras clínicas.



**Fonte:** Criado pela autora. Delineamento Experimental [Figura]. BioRender: <https://biorender.com/> (2023).

### 4.3. Confirmação de infecção viral

Para confirmar a infecção por MAYV no o estoque viral e também, nas amostras séricas e de tecido, realizou-se: 1) Extração de RNA e Transcrição reversa (4.3.1.). 2) Reação em cadeia da polimerase (qPCR) para MAYV (4.3.2). 3) Quantificação viral (4.3.3). 4). Imunofluorescência (4.3.4).

#### 4.3.1. Extração de RNA e Transcrição Reversa

Amostras coletadas em diferentes períodos embrionários serão processadas utilizando o aparelho *TissueLyser II* (QIAGEN, ALEMANHA) com auxílio de esferas de 5mm.

O sobrenadante das amostras processadas foi submetido a extração de RNA, com *kit* de Trizol (Invitrogen, EUA), seguindo recomendações do fabricante. Posteriormente, fez-se a transcrição reversa dos extratos com o *kit* M-MLV *Reverse Transcriptase* (MERCK), utilizando *primers* randômicos e seguindo as recomendações do fabricante.

Para confirmar a infecção por MAYV fez-se qPCR. Semente do estoque viral foi utilizado como controle positivo e sobrenadante de cultura celular não inoculada com vírus foi utilizada como controle negativo. Sobrenadantes das amostras de animais previamente processadas por *tissuelyser II* (QIAGEN, ALEMANHA) e sobrenadantes de isolamento também foram testados.

#### 4.3.2 Reação em cadeia da polimerase para MAYV em amostras de RT-qPCR

Após a transcrição reversa das amostras, os cDNAs foram normalizados com 250ng de cDNA por 1  $\mu$ L pelo equipamento nanoDrop (*Thermo Scientific*), sendo utilizados 2 $\mu$ L por reação. Após isso, foram submetidas à qPCR para MAYV que amplifica uma região do gene 5' UTR e NSP1 do MAYV, com os oligonucleotídeos iniciadores (Integrated DNA Technologies®, Coralville, Iowa, Estados Unidos) F (5'-AAGCTCTTCCTCTGCATTGC -3'), R1 (5'- TGCTGGAAACGCTCTCTGTA -3'), R2(5'- TGCTGGAAATGCTCTTTGTA -3') e a sonda de hidrólise TaqMan (TexasRed-5'- GCCGAGAGCCCGTTTTTAAAATCA-3'[BHQ2a-Q]3)' (Waggoner, *et al.*, 2018). Os ensaios de amplificação foram realizados em triplicata utilizando uma mistura de reação com 10 $\mu$ L de volume final. Várias sequências térmicas foram testadas para a padronização, sendo assim, ficou estabelecida a sequência térmica de: 95°C por 5 minutos

seguidos por 45 ciclos compostos por 95°C por 15 segundos e 50,2°C por 30 segundos. A viabilidade das amostras foi testada com os seguintes primers de genes endógenos GAPDH: GCACCGTCAAGGCTGAGAAC (Forward) e GCCTTCTCCATGGTGGTGAA (Reverse). As reações de amplificação foram conduzidas no aparelho da *Applied Biosystems StepOne™*. Também, foram feitas análises de sensibilidade das reações de qPCR, utilizando curva com 7 diluições decimais da semente de MAYV. O número de cópias-alvo foi calculado com base em 100% (aceitando variações de 95%-105%) de eficiência da extração do cDNA. A eficiência de amplificação foi calculada a partir da inclinação da curva padrão em cada experimento, pela seguinte fórmula ( $E = 10^{-1 / \text{inclinação}}$ ) (BUSTIN et al., 2009). Todas as análises foram realizadas obedecendo às normas estabelecidas pelo MIQE (*Minimum Information for publication of Quantitative real-time PCR Experiments*) (BUSTIN et al., 2009). Água ultrapura esterilizada (Nuclease-Free Water, Promega®, Madison, Wisconsin, Estados Unidos) foi utilizada como controle negativo nos ensaios de qPCR. Os resultados foram plotados na forma de RNA equivalente em 500 µg de cópias das sequências de MAYV.

#### 4.3.3. Quantificação viral

A quantidade do vírus MAYV, foi determinada em Unidades Formadoras de *Plaques* por mL. Para tanto, células VERO (ATCC-CCL-81) ( $2 \times 10^5$  células/poço) foram cultivadas em placas de 24 poços, em meio de cultura DMEM (Vitrocell, Campinas), suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SFB-Gibco, Austrália) e foram incubadas a 37°C com atmosfera de 5% CO<sub>2</sub>. Após confluência de 80%, as monocamadas celulares foram lavadas com solução tampão fosfato-salino (PBS) e inoculadas com 200 µL do vírus, em diluições decimais ( $10^{-1}$  a  $10^{-8}$ ) em DMEM. As placas ficaram incubadas a 37°C, em homogeneizador, por 50 minutos, para melhor distribuição da suspensão viral. Após esse tempo, a suspensão viral foi aspirada e adicionou-se 1mL de solução de *Overlay* (carboximetilcelulose 3% em meio MEM suplementado com 2% SFB) por poço. As placas foram novamente incubadas, por 2 dias, tempo suficiente para a formação de *plaques*. O sobrenadante foi removido e adicionou-se 1mL/poço de formalina tamponada 10% (solução líquida constituída por solução de formaldeído 10% em PBS 1x),

incubando-se por 1 hora, a temperatura ambiente. Em seguida, removeu-se a formalina por inversão vigorosa da placa e esta foi lavada em água corrente. Ao final, as células foram coradas com solução de preto de naftaleno, incubando-se por 1 hora em homogeneizador, a temperatura ambiente. Após este tempo, o corante foi aspirado e a placa lavada em água corrente e secada à temperatura ambiente. Ao final do processo, os *plaques* (áreas circulares com ausência de células) foram observados e contados.

Para cálculo do título viral, contaram-se os *plaques* individualizados e claramente visíveis. Com base nos números de *plaques* produzidos pela infecção viral e conhecendo-se os volumes inoculados das diferentes diluições virais, calculou-se a quantidade de vírus em Unidades Formadoras de *Plaques* por mililitro (UFP/mL), utilizando a fórmula:

$$\text{Média do número de } \textit{plaques} \times \text{diluição viral}$$


---


$$\text{Volume do inóculo viral (mL)}$$

#### 4.3.4. Imunofluorescência

Realizou-se o teste de imunofluorescência indireta (IFI), buscando por antígenos do MAYV, na cultura celular inoculada. Para tanto, células C6/36 foram semeadas sobre lamínulas de vidro, em placas de 24 poços ( $2 \times 10^5$  células / poço) com 300 $\mu$ L de meio L-15 4% de SFB. No dia seguinte, o sobrenadante foi removido e as células foram inoculadas com o MAYV (ou não, no caso do controle negativo as células foram incubadas apenas com o meio de cultivo celular). Após apresentarem efeito citopático as células foram fixadas com paraformaldeído a 4%, por 15 minutos, com posterior lavagem em PBS. Em seguida, foi realizada permeabilização celular com solução de saponina 1% diluída em PBS 1X por 10 minutos. Passado esse período foi realizada a etapa de bloqueio com gelatina porcina diluída na solução de saponina por 20 minutos, Em seguida, adicionou-se o anticorpo policlonal murino anti-MAYV diluído 500X em solução de saponina incubando as lamínulas por 30 minutos, a 29°C. Novamente, as lamínulas foram lavadas com PBS, e a elas adicionado o conjugado equino anti-mouse IgG (H+L) Alexa

fluor 488 (LIFE) e DAPI (1:1000), sendo incubadas por 30 min, à 29°C e em seguida lavadas com PBS. Finalmente, as lamínulas de vidro foram montadas em lâminas com Glicerol-PBS (9:1) e observadas ao microscópio de fluorescência (Nikon 120, Japão).

#### **4.4. Análises de dados**

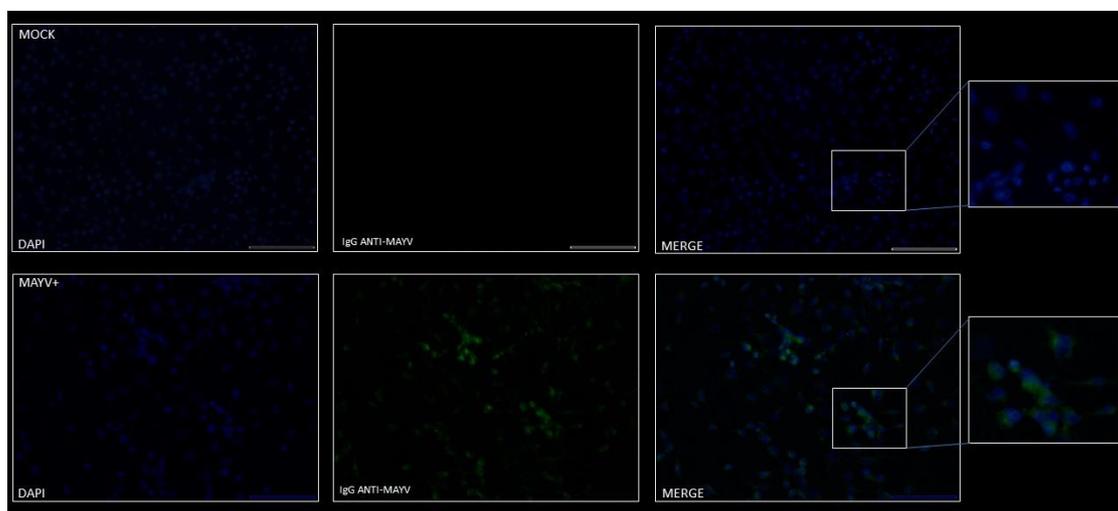
A avaliação do RNA, análise estatística e produção de gráficos foi realizada pelo *software GraphPad Prism 8.0.1*. Realizando test t e demais testes não paramétricos e não pareados. As diferenças foram consideradas significativas quando  $P < 0.05$ .

## 5. RESULTADOS

### 5.1. Produção da semente viral, confirmação e padronizações

Após a produção da semente (estoque) viral utilizada no presente trabalho, foram realizadas etapas para a confirmação da identidade viral e sua produção. Além da presença de efeito citopático como formação de grumos e morte celular, confirmou-se a infectividade viral, por método de imunofluorescência indireta, observando-se clara fluorescência verde citoplasmática dos antígenos de MAYV replicando no citoplasma celular, como mostra a **Figura 3**.

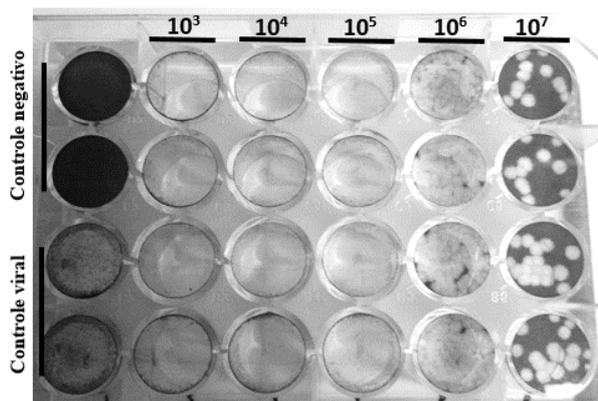
**FIGURA 3: Teste de imunofluorescência indireta para os vírus Mayaro (MAYV).** MOCK: Controle negativo, células de *Aedes albopictus* C6/36, inoculadas apenas com meio de cultivo celular L-15, exibindo apenas marcação nuclear em azul (DAPI). MAYV+: Células de *Aedes albopictus* C6/36 inoculadas com vírus Mayaro, exibindo, em azul marcação do núcleo celular e em fluorescência verde citoplasmática marcação viral, observada também presença de efeito citopático com formação de grumos celulares e morte celular nos espaços.



Após confirmar a presença de MAYV infectante, quantificou-se o vírus por titulação. Para tanto, contaram-se placas de *lise* celular. Observou-se que a semente de

MAYV possuía  $2 \times 10^8$  UFP (Unidades Formadoras de Placas) por microlitro (mL), como mostra a **Figura 4**.

**FIGURA 4: Fotografia de placa com titulação do MAYV.** Placa com 24 poços contendo células Vero infectadas com diluições decimais de MAYV ( $10^{-3}$  a  $10^{-7}$ ), mostrando *plaques* individualizados e contáveis nos orifícios inoculados com  $10^{-7}$ , o que permitiu quantificar o estoque de MAYV em  $2 \times 10^8$  UFP/mL.



Também, fez-se RT-qPCR específico para MAYV no estoque viral, confirmando sua identidade. Os testes iniciais mostraram baixa eficiência (80% aproximadamente) e, por isso, foi necessário padronizar o método realizando-se gradientes de temperatura e concentrações de *primers*. Com isso, obteve-se resultados apresentando eficiência de 100%, considerando desvio de 5% (acima ou abaixo deste valor). O estoque viral foi utilizado como base para gerar uma curva padrão de amplificação utilizando diluições seriadas na base 10. Para as amostras de sangue, baço, cérebro, coração, fígado, rins, pulmão, soro e placenta, analisadas em triplicatas, foram aceitos apenas resultados variando 0,5 Ct (*cycle threshold*) e utilizaram-se seus valores médios.

## 5.2. Teste por RT-qPCR MAYV das amostras dos grupos G1, G2, G3, G4 e G5 com infecção no início da gestação (E5.5 e E8.5)

Cinco grupos de animais foram organizados para avaliar a infecção por MAYV no início da gestação E5.5 (G1, G2, G3) e E8.5 (G4 e G5). Nos G1, G2 e G3, a infecção viral foi realizada no dia embrionário 5.5 (E5.5) e nos G4 e G5 a infecção ocorreu no E8.5.

O G1, incluiu amostras de 2 camundongos fêmeas infectadas com  $10^7$  UFP de MAYV no dia embrionário (E) 5.5 (E5.5). Os animais foram eutanasiados no dia E10.5 (E5.5/E10.5) para coleta de amostras. Ao todo, nos 2 animais, obtiveram-se 13 fetos, divididos em feto (coletou-se o feto inteiro devido ao seu desenvolvimento embrionário precoce), também, foram coletadas 13 placentas. Os teores de MAYV maternos foram analisados por RT-qPCR, dentre os diferentes órgãos dos animais eutanasiados, observou-se MAYV no coração, pulmão e baço da fêmea 1 (F1) e no coração da fêmea 2 (F2), como mostrado na **Tabela 1**.

**TABELA 1: RT-qPCR em amostras maternas do grupo G1.** Presença de MAYV confirmada por RT-qPCR em diferentes órgãos maternos, sendo + representativo de positividade e – de negatividade. F1: fêmea 1, F2: Fêmea 2 e MOCK fêmea do controle negativo.

ÓRGÃOS	FÊMEAS G1 RT-qPCR		MOCK
	F1	F2	
CORAÇÃO	+	+	-
FÍGADO	-	-	-
PULMÃO	+	-	-
BAÇO	+	-	-
RINS	-	-	-

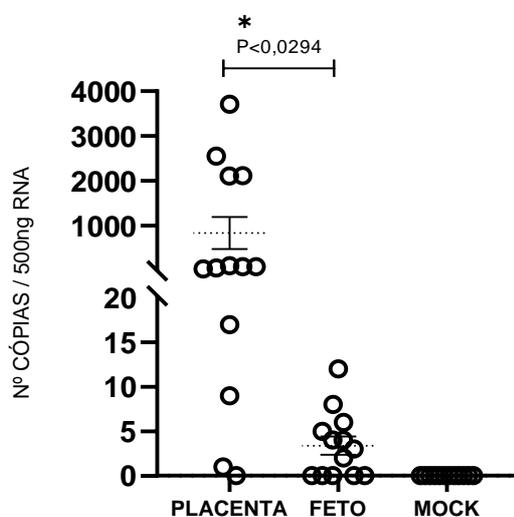
Das demais amostras fetais dos G1, a placenta foi a que mais apresentou positividade, 92,3% de RNA viral e encontrou-se 61,5% de positivos dentre os fetos,

como mostra a **Tabela 2**. Esta diferença de positividade entre placenta e fetos foi significativa ( $p < 0.0294$ ), como observa-se na **Figura 5**.

**TABELA 2: RT-qPCR em amostras fetais do grupo G1.** Infecção por MAYV detectada por RT-qPCR em amostras de 13 fetos G1 e suas placentas. Número total de amostras positivas ( $n^\circ$ ) e porcentagem.

FETOS G1		
(Nº 13)		
	PLACENTAS	FETOS
Nº positivos / Nº total	12/13	8/13
Porcentagem	92,3%	61,5%

**Figura 5: Quantificação de MAYV por RT-qPCR em placentas e fetos do G1.** Análise realizada por número ( $N^\circ$ ) de cópias de RNA por 500ng de RNA, em placentas e fetos, onde apresentam diferença estatística de  $P < 0,0294$ . Estão plotadas no gráfico a média das triplicatas das amostras testadas. O MOCK está representando em conjunto único todas as amostras de placenta e fetos testados.



**G1**

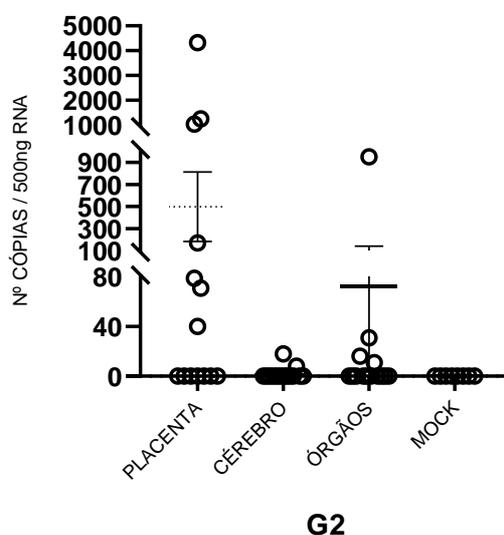
O G2 incluiu 2 camundongos fêmeas que foram infectados com  $10^7$  UFP de MAYV no E5.5 e foram eutanasiados no dia E15.5 (E5.5/E15.5). Coletaram-se amostras de 14 placentas e de 14 fetos, com cérebros e outros órgãos (nesta idade gestacional foi possível coletar o cérebro). Analisou-se por RT-qPCR os diferentes órgãos maternos

coletados na cirurgia pós-eutanásia e MAYV foi detectado em baço e cérebro da F1 e no coração, pulmão, baço, rins e cérebro da F2 como mostra a **Tabela 3**. Nas amostras fetais e de placenta foi possível encontrar presença de RNA de MAYV, em diversas delas, porém sem diferenças significantes, como mostra a **Figura 6**.

**TABELA 3: RT-qPCR em amostras maternas do grupo G2.** Presença de MAYV confirmada por RT-qPCR em diferentes órgãos maternos, sendo + representativo de positividade e – de negatividade. F1: fêmea 1, F2: Fêmea 2 e MOCK: fêmea controle negativo.

FÊMEAS G2 RT-qPCR			
ÓRGÃOS	F1	F2	MOCK
CORAÇÃO	-	+	-
FÍGADO	-	-	-
PULMÃO	-	+	-
BAÇO	+	+	-
RINS	-	+	-
CÉREBRO	+	+	-

**FIGURA 6: Quantificação de MAYV por RT-qPCR em placentas e órgãos fetais do G2.** Análise realizada por número (Nº) de cópias de RNA por 500ng de RNA, em placentas, cérebros e órgãos fetais, nos quais não apresentaram diferente estatística. Estão plotadas no gráfico a média das triplicatas das amostras testadas. O MOCK está representando em conjunto único todas as amostras de placenta, cérebro e órgãos testadas.



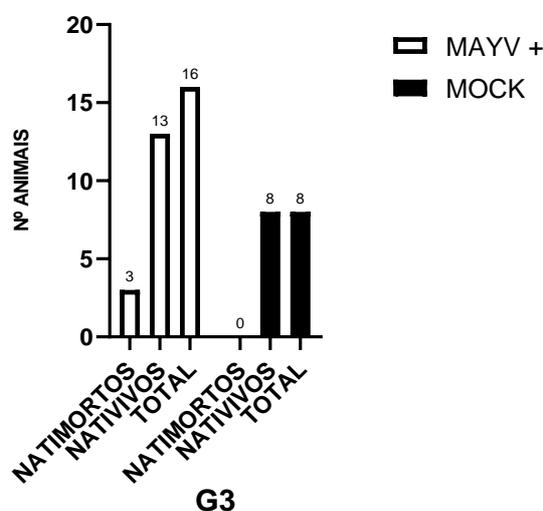
No G2 observou-se 50% (7/14) de positividade em placentas, 14,2% (02/14) para os cérebros e 28,5% (04/14) nos outros órgãos, o que pode ser observado na **tabela 4**.

**TABELA 4: Infecção por MAYV nos fetos do G2.** Analisada por RT-qPCR em amostras de 14 fetos do G2, separados segundo placentas, cérebros e órgãos, representados em número real (nº) de positivities e porcentagem.

FETOS G2			
(Nº 14)			
	PLACENTAS	CÉREBROS	ÓRGÃOS
Nº positivos / Nº total	07/14	02/14	04/14
Porcentagem	50%	14,2%	28,5%

O G3 incluiu 3 camundongos gestantes infectadas com  $10^7$  UFP de MAYV no E5.5 e mantidas até o parto natural. Nasceram 16 filhotes, sendo 3 natimortos (18,75%) e 13 vivos (81,25%), como mostra a **Figura 7**. Os recém-nascidos sobreviventes foram observados até a vida adulta. Dos natimortos, foram coletados cérebros e outros órgãos. Também, em 2 animais nascidos vivos, coletou-se sangue com 2 semanas. Os materiais foram submetidos a RT-qPCR. Em 2 dos 3 fetos natimortos encontrou-se RNA de MAYV em cérebro (66,6%). Os dois filhotes nascidos vivos, também estavam infectados com MAYV após 2 semanas. Uma fêmea MOCK teve 8 filhotes, sem mortes após o nascimento.

**FIGURA 7: Representação numérica G3.** Representação numérica de natimortos, nativos e número total de nascidos nos grupos onde a mãe foi infectada com o vírus Mayaro (MAYV+) e quando não foi (MOCK).



O G4 difere dos demais grupos de camundongos citados anteriormente. Neste grupo, dois camundongos gestantes foram infectadas com  $10^7$  UFP de MAYV no dia E8.5 e a coleta de amostras foi realizada no dia E13.5, como mostra a **Figura 2**. Escolheu-se esse período gestacional considerando a formação do labirinto, fase crucial com funções de nutrição e oxigenação para a placenta e feto. Na F1, detectou-se genoma de MAYV por RT-qPCR em coração, pulmão, baço, rins e cérebro. E na F2 apenas no coração como mostra a **Tabela 5**.

**TABELA 5: RT-qPCR em amostras maternas do grupo G4.** Presença de MAYV confirmada por RT-qPCR em diferentes órgãos maternos, sendo + representativo de positividade e – de negatividade no teste RTqPCR. F1: fêmea 1 e F2: Fêmea 2. MOCK: fêmea controle negativo.

FÊMEAS G4 RT-qPCR			
ÓRGÃOS	F1	F2	MOCK
CORAÇÃO	+	+	-
FÍGADO	-	-	-
PULMÃO	+	-	-
BAÇO	+	-	-
RINS	+	-	-
CÉREBRO	+	-	-

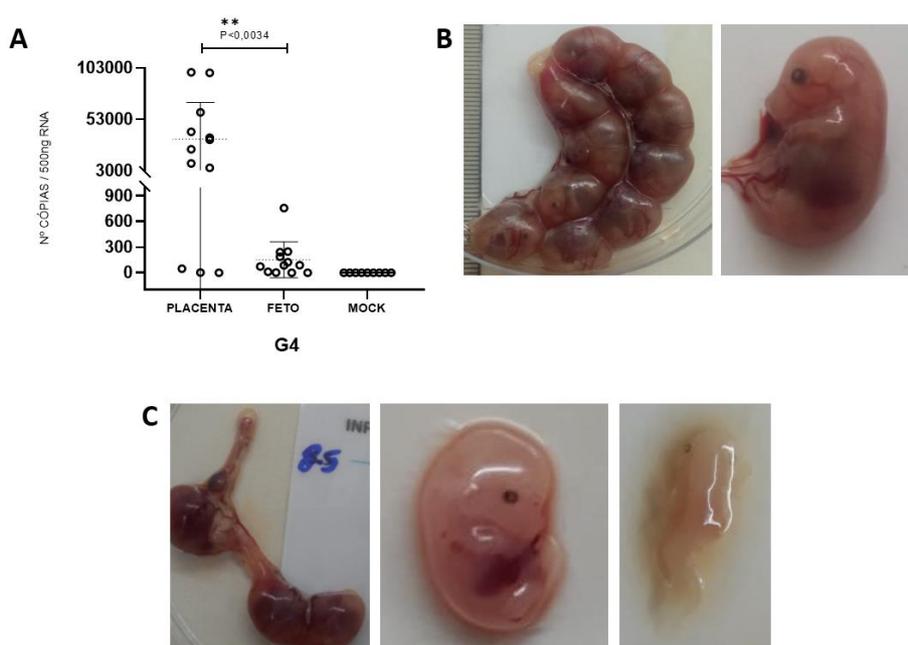
Dos 12 filhotes do G4 coletados, todas as suas placentas e os fetos estavam infectados por MAYV, as porcentagens de positividade dos fetos estão representadas na **Tabela 6**.

Observou-se que as diferentes positivities entre placentas e fetos foram significantes ( $P < 0,0034$ ) como mostra a **Figura 8A**. Neste grupo foram coletados fetos inteiros devido ao minúsculo tamanho dos mesmos, **Figura 8C**. Da fêmea MOCK foram coletados 10 fetos representados na **Figura 8B**, todos negativos para RT-qPCR MAYV.

**TABELA 6: Infecção por MAYV nos fetos do G4.** Analisada por RT-qPCR em amostras de 14 fetos do G2, separados segundo placentas, cérebros e órgãos, representados em número real (nº) de positivities e porcentagem.

FETOS G4 (Nº 12)		
	PLACENTAS	FETO
Nº positivos / Nº total	12/12	12/12
Porcentagem	100%	100%

**FIGURA 8: Quantificação de MAYV por RT-qPCR e fotografias dos fetos do G4.** A) Análise realizada por número (Nº) de cópias de RNA por 500ng de RNA, em placentas e fetos. Estão plotadas no gráfico a média das triplicatas das amostras testadas. O MOCK está representando em conjunto único todas as amostras de placenta e feto. B) Fotografia do útero da MOCK e de um feto. C) Fotografia do útero da MAYV+ e de dois fetos.



No G5, camundongos fêmeas foram infectadas no E8.5 e aguardou-se por seus partos naturais. Assim, enquanto no grupo controle negativo, a fêmea inoculada (apenas com o meio de cultivo celular-L15), teve 10 filhotes saudáveis, as fêmeas infectadas com MAYV comeram seus filhotes antes que pudessem ser coletados, em 2 tentativas. Portanto não foi possível conhecer a quantidade de filhotes, nativos ou natimortos no G5.

### 5.3. Teste por RT-qPCR MAYV das amostras dos grupos com infecção no período mediano (E10.5) da gestação (G6 e G7)

Nos grupos G6 e G7, a infecção por MAYV ocorreu em meados da gestação dos camundongos fêmeas (E10.5). No G6 fez-se cirurgia pós-eutanásia para coleta de amostras, no dia E15.5. As mães infectadas apresentaram RNA de MAYV apenas no coração, como mostra a **Tabela 7**. Já no G7 as mães foram infectadas no E10.5 e mantidas até o parto natural.

**TABELA 7: RT-qPCR em amostras maternas do grupo G6.** Presença de MAYV confirmada por RT-qPCR em diferentes órgãos maternos, sendo + representativo de positividade e – de negatividade no teste RTqPCR. F1: fêmea 1 e F2: Fêmea 2 e MOCK fêmea do controle negativo.

FÊMEAS G6			
RT-qPCR			
ÓRGÃOS	F1	F2	MOCK
CORAÇÃO	+	+	-
FÍGADO	-	-	-
PULMÃO	-	-	-
BAÇO	-	-	-
RINS	-	-	-
CÉREBRO	-	-	-

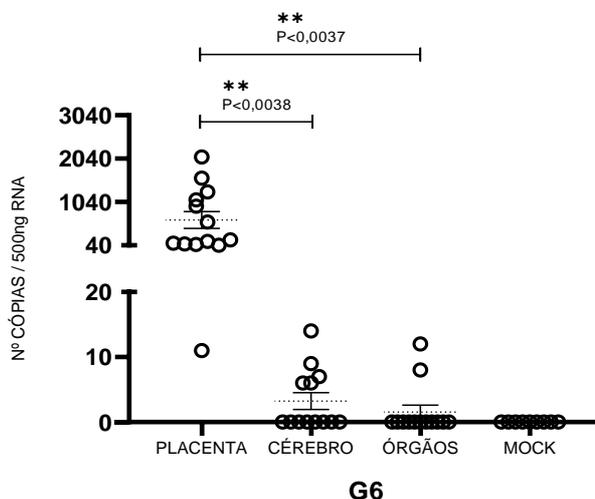
No G6 os 13 filhotes retirados pós-eutanásia. Ao testar as amostras das 13 placentas, observou-se 100% de positividade, 38,4% em cérebro e 15,3% no macerado de outros órgãos, como mostra a **Tabela 8**.

**TABELA 8: Infecção materna por MAYV em camundonga G6, confirmada por RT-qPCR.** Nos 13 fetos G6, analisaram-se as positivities em placentas, cérebros e outros órgãos. Os dados são mostrados em número real (nº) e porcentagem.

FETOS G6			
(Nº 13)			
	PLACENTAS	CÉREBRO	ÓRGÃOS
Nº positivos / Nº total	13/13	05/13	02/13
Porcentagem	100%	38,4%	15,3%

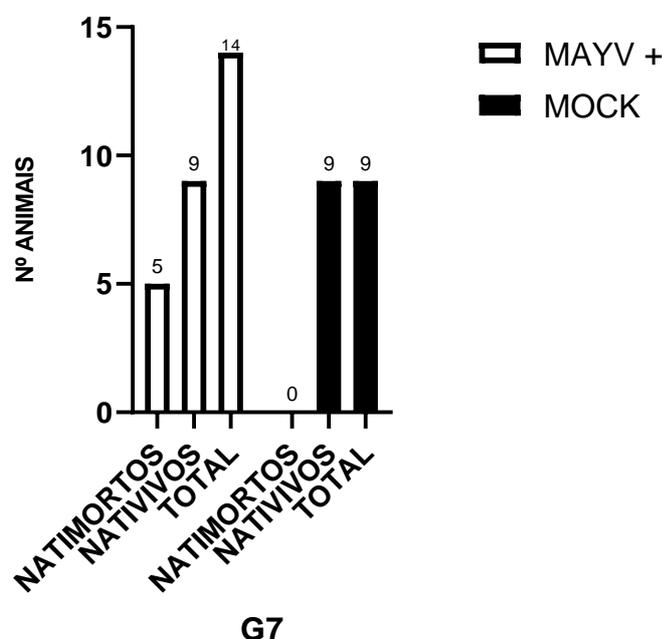
Observou-se diferença significativa de positivities em placentas e nos outros órgãos dos fetos do G6 ( $P < 0,0038$  para placenta/cérebro, e  $P < 0,0037$  para placenta e outros órgãos), como mostra a **Figura 9**.

**FIGURA 9: Quantificação de MAYV por RT-qPCR em placentas e órgãos fetais do G6.** Análise realizada por número (Nº) de cópias de RNA por 500ng de RNA, em placentas, cérebros e órgãos fetais. Estão plotadas no gráfico a média das triplicatas das amostras testadas. O MOCK está representando em conjunto único todas as amostras de placenta, cérebro e órgãos testadas. Observou-se diferença significativa  $P < 0,0038$  entre placentas e cérebros e  $P < 0,0037$  entre placenta e outros órgãos.



No G7, 2 fêmeas infectadas com  $10^7$  UFP de MAYV no dia E10.5 foram mantidas até o parto natural, para avaliação dos filhotes. Nasceram 14 filhotes, 9 vivos e 5 natimortos, totalizando 35,7% de taxa de natimortos, como mostra a **Figura 10**. Dos 9 filhotes foram analisadas amostras de 4 animais após 2 semanas do nascimento, dessas amostras encontrou-se RNA de MAYV em 1 (25%) foi positiva pelo RT-qPCR MAYV e dos 5 fetos natimortos, em 1 (20%) foi encontrado genoma viral em cérebro e no seu macerado de outros órgãos.

**FIGURA 10: Representação numérica G7.** Representação numérica de natimortos, nativos e número total de nascidos nos grupos com infecção materna pelo vírus Mayaro (MAYV+) e quando não foi (MOCK).

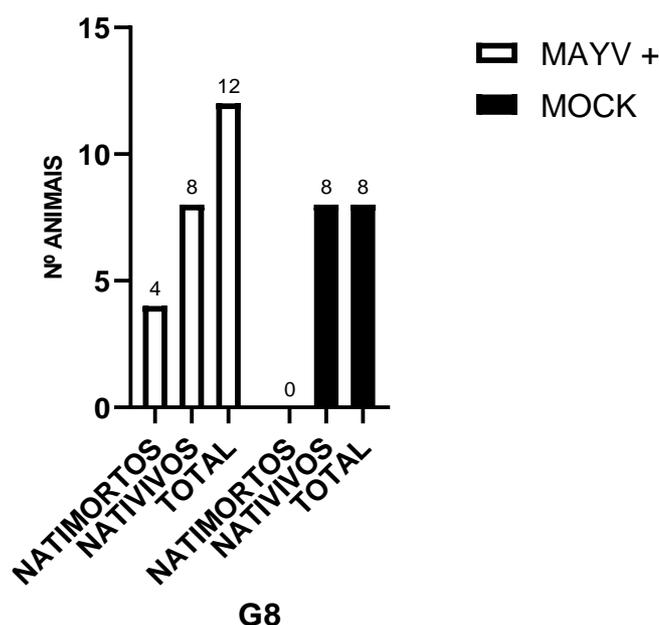


#### 5.4. Avaliação por RT-qPCR MAYV das amostras do grupo G8 com infecção no período final da gestação (E15.5)

Por fim, em um último grupo de 3 animais gestantes (G8), buscou-se avaliar a infecção por MAYV no final da gestação (E15.5), considerando a infecção perinatal ou pós-natal. Os camundongos fêmeas gestantes foram infectadas com  $10^7$  UFP de MAYV no dia E15.5 e foram mantidas até o parto natural, para avaliação dos filhotes. Nasceram 12 filhotes em 2 fêmeas, sendo 4 natimortos e 8 nativos, como mostra a **Figura 11**. Ao

avaliar por RT-qPCR nos natimortos, uma das quatro amostras do cérebro (25%) mostrou presença de RNA viral do MAYV e nenhuma delas apresentou RNA em outros órgãos.

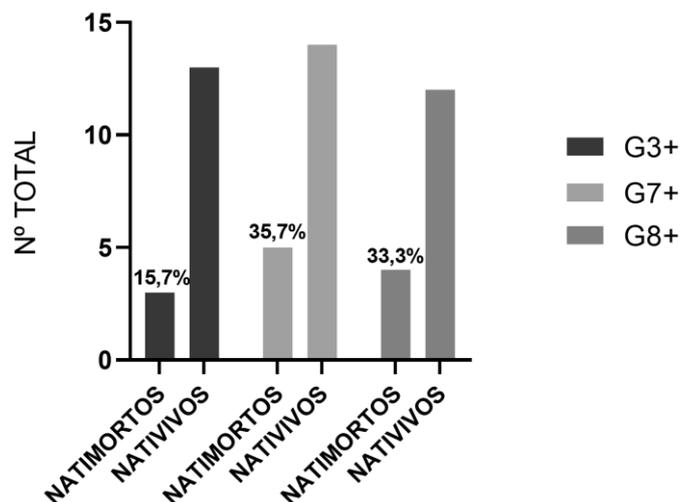
**FIGURA 11: Representação numérica G8.** Representação numérica de natimortos, nativos e número total de nascidos nos grupos com infecção materna pelo vírus Mayaro (MAYV+) e quando não foi (MOCK).



Uma dentre as três fêmeas gestantes apresentou sinais de complicação durante o parto, sendo necessária a realização de eutanásia, seguida de cesariana para a retirada dos fetos. Imagens dos fetos coletados e a análise por RT-qPCR MAYV estão representados na **figura 12**. A **figura 12A** é o representativo da análise por RT-qPCR mostrando positividade de 100% das placentas coletadas e 44% de positividade nos cérebros dos fetos, os outros órgãos dos fetos não apresentou positividade para RNA viral, quando realizada análise os valores de detecção viral foram estatisticamente significativos entre o grupo placenta e cérebro com  $P < 0,0008$ . Na **figura 12B**, foi possível observar em um dos fetos coletados alteração anatômica na região cranioencefálica e quando seus órgãos internos foram expostos, não foi possível diferenciá-los. Essa segunda intercorrência foi observada em outros fetos.

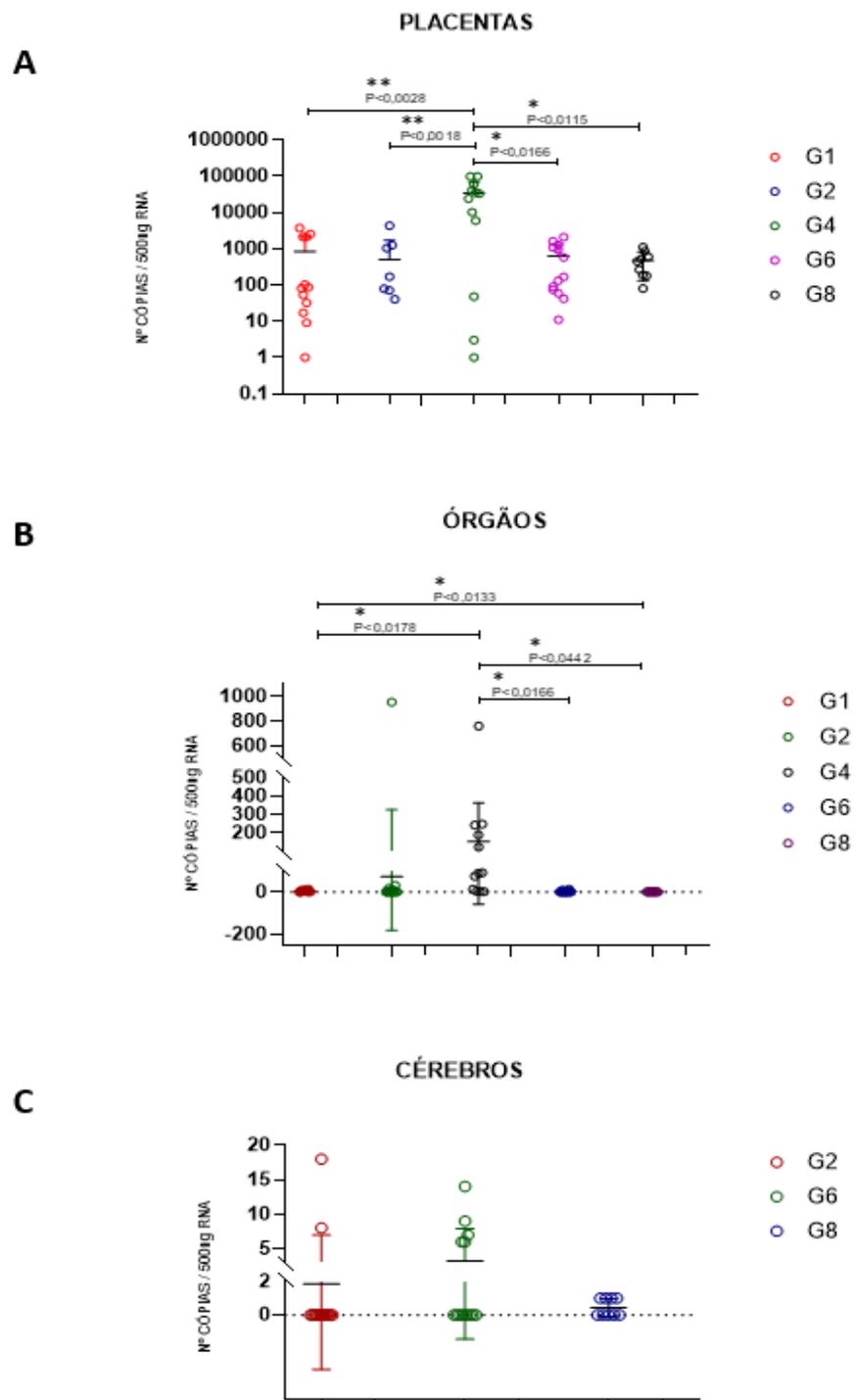


**FIGURA 13: Comparação entre os grupos G3, G7 e G8.** Representação comparativa dos números e porcentagens de fetos natimortos e nativos de camundongos fêmeas infectadas com MAYV observados em G3, G7 e G8.



Para fins comparativos, juntou-se os resultados do qPCR MAYV entre as mesmas amostras dos diferentes grupos, estes resultados estão representados na **Figura 14A, B e C**. Na **Figura 14A** encontrou-se diferença significativa entre as placentas do G4 e todos os outros grupos ali plotados. Na **Figura 14B**, encontrou-se diferença significativa entre os macerados de órgão do grupo G1 e G8 ( $P < 0,0133$ ), G1 e G4 ( $P < 0,0178$ ), G4 e G6 ( $P < 0,0166$ ) e G4 e G8 ( $P < 0,0442$ ). Na **Figura 14C**, quando comparados os cérebros, não obteve nenhum grupo com diferença estatística significativa se comparado com os demais.

**FIGURA 14: Quantificação de MAYV por RT-qPCR nas mesmas amostras de diferentes grupos.** Análise realizada por número (Nº) de cópias de RNA por 500ng de RNA, em diferentes grupos das placentas, cérebros e órgãos fetais. Estão plotadas no gráfico a média das triplicatas das amostras testadas.



## 6. DISCUSSÃO

Infecções virais transmitidas verticalmente em humanos são amplamente descritas na literatura e podem causar diversos problemas tanto no desenvolvimento fetal quanto para a gestante (AURITI et al., 2021; CALVET et al., 2016; CAUCHEMEZ et al., 2016; GÉRARDIN et al., 2014; NEELAM et al., 2023; PAIXAO et al., 2018; RASMUSSEN; JAMIESON, 2022; TIEN DAT et al., 2018; VODUŠEK et al., 2016; WOODWORTH, 2020). Um trabalho usando modelo murino para outros *Alphavirus* demonstrou que a infecção de camundongos prenhes com os vírus Ross River e Getah resultou em infecção fetal por esses vírus. No entanto, apenas o vírus Ross River causou morte fetal significativa. Observou-se mortalidade pós-parto significativa em camundongos infectados com o Ross River, mas não com o vírus Getah (AASKOV et al., 1981). Esses resultados evidenciam que infecções por *Alphavirus*, podem provocar complicações graves neurológicas e consequentemente elevada taxa de natimortos. Importa ressaltar que a transmissão vertical pode variar entre as diferentes espécies de vírus e entre as populações hospedeiras.

Dentre os *Alphavirus* já conhecidos como causadores de infecção durante o período gestacional humano, podemos citar o vírus Chikungunya, vírus O'nyong-nyong. O vírus Chikungunya, o mais estudado, possui alta taxa de transmissão vertical ocorrendo em até metade das mães que são virêmicas durante o trabalho de parto. Os sintomas neonatais desenvolvem-se entre 3 e 7 dias de vida, variando desde apresentação leve (43%) até infecção grave por encefalite (53%), que requer cuidados intensivos (CHARLIER et al., 2017). Entretanto, até o presente momento, não há muitos relatos na literatura sobre a transmissão vertical humana causada pelo *Alphavirus* Mayaro. Trata-se de um vírus emergente que ganha importância crescente no Brasil pois começa a ocorrer na região mais povoada do Sudeste do país. Recentes estudos observaram amostras sorológicas positivas para MAYV vindas de pacientes saudáveis doadores de sangue no interior do estado de São Paulo (ROMEIRO et al., 2020). Esta situação poderá expor gestantes à infecção por MAYV. Os resultados apresentados nesta Tese mostram, pela primeira vez, a transmissão vertical pelo vírus Mayaro em modelo experimental murino nos diferentes períodos gestacionais.

Sabe-se que as infecções pelo *alphavirus* Mayaro podem produzir alta viremia em seres humanos (MUÑOZ; NAVARRO, 2012), em mosquitos *Aedes aegypti*, o título viral

pode variar entre 3,4 log<sub>10</sub> e 7.3 log<sub>10</sub> (TESH et al., 2011) e em camundongos, também apresentam alta viremia variando entre 2,5x10<sup>8</sup> e 2,5x10<sup>9</sup> (KROKOVSKY et al., 2023). Neste trabalho, buscamos causar infecção aguda com sinais clínicos evidentes no modelo experimental murino e considerando o curto período gestacional de camundongos. Para tanto, inoculamos os camundongos fêmeas gestantes com 10<sup>7</sup> UFP em 100uL de MAYV pela veia caudal (ROSA et al., 2023).

A via de liberação do vírus pós-inoculação exerce uma influência crucial sobre os efeitos espaciais e temporais do vírus no hospedeiro animal. A inoculação intravenosa (I.V.), no modelo experimental deve simular a refeição de sangue com a qual o mosquito vetor transmite vírus ao ser humano. Além disso, a administração I.V. possibilita uma disseminação sistêmica mais rápida do vírus, o que provavelmente resultará em doença no camundongo, especialmente quando não são utilizados animais imunossuprimidos (LI; KIM; SHRESTA, 2023; REGLA-NAVA et al., 2018). Portanto, a inoculação de MAYV em alta dose por via I.V., na veia caudal dos camundongos fêmeas gestantes, foi a via escolhida para infecção para este trabalho.

Neste estudo de transmissão viral vertical, estudamos a placenta dos animais. Trata-se de órgão vital na gravidez, pois fornece nutrientes e oxigênio ao feto em desenvolvimento e por ela pode passar o patógeno ao feto. Por outro lado, um funcionamento placentário adequado é essencial para o crescimento e desenvolvimento fetal (BAUER et al., 1998; WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018).

Os tempos de infecção no estudo foram minuciosamente escolhidos considerando eventos importantes do desenvolvimento placentário e fetal-embriônico. No dia de gestação 6.5 (estudado no grupo de animais E6.5), a placenta murina encontra-se em fase de implantação. As vilosidades coriônicas estão se desenvolvendo rapidamente e começando a se conectar aos vasos sanguíneos uterinos. Nesta fase, a placenta começa a produzir hormônios, como o estrogênio e a progesterona. Estes hormônios desempenham funções importantes, incluindo a manutenção da gravidez, desenvolvimento do feto e preparam o corpo materno para o parto (CHENG et al., 2023). Para estudar este período, foram criados os grupos G1, G2 e G3. Nos camundongos fêmeas do grupo G1 (infecção no dia E5.5 e eutanásia no dia E10.5), a infecção viral foi bem-sucedida, com encontro de genomas virais em diferentes órgãos de um animal e apenas o coração no outro. Nos camundongos fêmeas do grupo G2 (infecção no dia E5.5 e eutanásia no dia E15.5), a disseminação viral foi maior, entretanto uma camundonga mostrou-se negativa para

MAYV no coração. Os resultados observados comparativamente entre os camundongos fêmeas de G1 e G2 mostram uma infecção bem sucedida por MAYV em todos os casos e também que a infecção progrediu com a evolução da infecção (LI; KIM; SHRESTA, 2023; REGLA-NAVA et al., 2018).

Quanto às placentas dos camundongos fêmeas do grupo G1, estas mostraram alta taxa de infecção viral por MAYV, com positividade acima de 90%. Comparando as placentas dos camundongos fêmeas do grupo G1 com aquelas do grupo G2, observamos redução no número de infecções para 50%. Acreditamos que nas placentas mais desenvolvidas dos camundongos fêmeas do G2 as células locais de defesa, como os trofoblastos e organóides da decídua, produzindo citocinas, conseguiriam combater o vírus de forma mais eficaz. Essa resposta imune pode ajudar a reduzir a replicação viral, como observado nas placentas dos camundongos fêmeas do grupo G2. Entretanto, mesmo nesta fase, a infecção por MAYV pode causar danos à placenta e interferir no desenvolvimento fetal (YANG et al., [s.d.]). Os teores de MAYV placentários, com base no número de cópias amplificadas nos grupos G1 e G2, não exibiram diferenças significantes.

Quanto aos fetos dos grupos G1 e G2 de camundongos fêmeas com MAYV, observou-se uma redução no número de infectados com o decorrer dos dias pós-infecção, 60% dos fetos do grupo G1 encontravam-se infectados e 28,5% nos do G2. Também, nos fetos do grupo G2, mais desenvolvidos, foi possível coletar os cérebros e 7,14% deles encontravam-se infectados. Portanto, indiscutivelmente, o *alphavirus* Mayaro foi capaz de atravessar a barreira placentária e infectar os fetos, inclusive seus cérebros em formação. Esta é a primeira vez em que se descreve a transmissão vertical de MAYV em camundongos com detecção viral no cérebro dos fetos. Para ressaltar a importância do achado, sabe-se que MAYV é capaz de infectar células do sistema nervoso central humano (BENGUE et al., 2021).

No grupo G3, em que os camundongos fêmeas infectadas com MAYV puderam completar a gestação, observou-se que 18,75% das proles eram natimortas. Dois dos três fetos natimortos tinham infecção por MAYV no cérebro e isto não foi observado em outros órgãos fetais. Tais dados são similares aos encontrados em fetos humanos natimortos do surto de vírus Chikungunya, relacionado filogeneticamente ao MAYV, ocorrido na Ilha da Reunião, em 2006, onde descreveram 2 de 3 fetos infectados no cérebro com aquele vírus. Neste caso, todos os fetos humanos natimortos foram abortados

antes de 12 semanas de gestação (TOURET et al., 2006). Voltando aos camundongos recém-nascidos do G3, os animais encontravam-se aparentemente normais e tiveram bom desenvolvimento até a vida adulta. Entretanto, destes animais, 2 dos quais foi possível coletar sangue, apresentavam viremia por MAYV em 2 semanas após o nascimento. É possível que imunoglobulinas transferidas com o aleitamento materno tenham protegidos estes animais infectados de manifestações mais graves (CHU; ENGLUND, 2014).

Em um trabalho com camundongos fêmeas C57BL/6J infectadas por MAYV, com 6.5 dias de gestação, as fêmeas foram inoculadas pela via subcutânea com  $10^2$  PFU de CHIKV ou MAYV e foram eutanasiadas no dia 13.5. Naquele estudo, concluiu-se que MAYV e CHIKV não causam danos placentários ou fetais substantivos, sem evidências de morte ou lesão fetal por estes vírus, esses resultados, diferentes dos nossos, não confirmam que MAYV possa causar infecção vertical a partir de mães infectadas. Explicamos a divergência de resultados lembrando que a via de infecção foi diferente e a quantidade de MAYV inoculada. Naquele trabalho, embora a infecção por MAYV tenha ocorrido com 6.5 dias gestacionais a cesariana pós eutanásia ocorreu apenas com 13.5 dias de gestação o que, também, explicaria os resultados negativos (PLATT et al., 2018).

Sabendo que, entre 7.5 e 9.5 dias de gestação, a placenta dos camundongos fêmeas se desenvolve rapidamente. As vilosidades coriônicas se conectam aos vasos sanguíneos uterinos e a placenta começa a produzir hormônios, incluindo o estrogênio, a progesterona e a gonadotrofina coriônica (mCG). Nesta fase, a placenta começa a fornecer nutrientes e oxigênio ao feto em quantidades adequadas ao seu crescimento e desenvolvimento. Resumidamente, isto é chamado de labirinto murino, um marco importante na gravidez. Por esta razão, escolhemos, no grupo G4, o dia intermediário da gestação, E8.5, para infectarmos os camundongos fêmeas com MAYV. Em G4 observamos viremia materna com base no coração removido no dia 13,5, de ambas as mães. Também, em 1 destes camundongos fêmeas observamos a infecção por MAYV em outros órgãos com pulmão, baço, rim e cérebro. Nas placentas dos camundongos fêmeas do G4 todas se apresentavam infectadas e com altos teores virais ( $10^5$  cópias virais por 500ng do RNA de MAYV). Acreditamos que a imunidade placentária não tenha sido efetiva nesta fase inicial da gestação.

Com relação aos camundongos fêmeas do G4, os fetos infectados exibiam atraso no desenvolvimento se comparados aos fetos do controle negativo. Os fetos infectados eram muito menores e sem diferenciação de órgãos. Acreditamos que tenha havido restrição de

crescimento intrauterino (RCIU) o que é frequentemente causado por mau funcionamento placentário, em nosso caso devido à infecção. Na RCIU, ocorre hipertrofia dos trofoblastos placentários e remodelamento das artérias espirais maternas provocando prejuízo ao feto em formação (WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018).

O grupo 5 (G5) de camundongos fêmeas infectadas com MAYV no dia 8,5 de gestação, estas deram a luz a fetos doentes ou mortos, apesar de, visualmente, as fêmeas estarem com os fetos crescendo em suas barrigas, como nos demais grupos. Entretanto, não conseguimos coletar filhotes doentes, porque as partições dos camundongos fêmeas costumam ser noturnas e as mães, provavelmente, comeram logo os nascituros, para limpeza do ambiente. Assim, não foi possível avaliar estes animais. Em camundongos, a mortalidade perinatal pode incluir a perda de toda a ninhada, e isto explicaria o canibalismo das mães. Dentre os motivos do canibalismo a privação de alimento não foi o caso no G5, onde o alimento foi fornecido de forma livre aos animais. Entretanto, o canibalismo também, ocorre para proteção contra doenças, como vírus. O canibalismo ocorre quando o feto já nasce morto ou quando a mãe mata fetos doentes (BELLISARIO et al., 2015; BRAJON et al., 2021; LANE-PETTER, 1968).

No grupo 6 (G6) de camundongos fêmeas infectadas com MAYV, estas infecções ocorreram em período mediano, no dia 10,5 da gestação e os animais foram eutanasiados com 15,5 dias de gestação. Nesta fase a placenta encontra-se completamente formada e funcionando corretamente, fornecendo nutrientes e oxigênio ao feto e começando a produzir anticorpos (BAUER et al., 1998; LI; KIM; SHRESTA, 2023; WOODS; PEREZ-GARCIA; HEMBERGER, 2018). No G6, os camundongos fêmeas mostraram-se infectadas por MAYV. Quanto às placentas, observou-se que 100% encontravam-se infectadas de forma similar ao observado nos grupos G1 e G4 onde foi realizada eutanásia e cesariana nos camundongos fêmeas após 5 dias de infecção independente do período gestacional. Nestes 3 grupos, observou-se altas viremias nas placentas. Entretanto, quanto aos fetos, os fetos do G6 38,4% exibiam altas viremias em cérebro e em outros órgãos, 15,3%. Estas positivities, comparando-se placenta e cérebro e placenta e órgãos mostraram significantes diferenças de forma similar ao observado nos grupos G1 e G4. Surpreendeu-nos não encontrar menor positividade de fetos infectados com MAYV no G6, quando às placentas encontravam-se maduras. Mais experimentos seriam necessários para analisar esta fase da infecção gestacional em camundongos fêmeas por MAYV.

Para completar os estudos, fez-se a infecção dos camundongos fêmeas por MAYV no período mediano da gestação em G7. Nos camundongos fêmeas infectadas do G7, 35,7% de natimortos foram observados. Nos 5 natimortos 1 apresentava infecção por MAYV no cérebro e nenhum os natimortos exibiu infecção por MAYV em outros órgãos. Dos 9 filhotes que nasceram vivos, 4 foram analisados e 1 deles apresentava viremia. Estes 9 filhotes, inclusive aquele com viremia, tiveram adequado desenvolvimento até a vida adulta. Também, no caso do G7, o aleitamento materno deve ter colaborado na proteção imune dos nascituros (CHU; ENGLUND, 2014).

No grupo G8, de camundongos fêmeas infectadas com MAYV ao final da gestação, dia 15,5 de gestação, analisaram-se os nascituros. Nesta fase a placenta está completamente desenvolvida e funcional. O feto está em rápido crescimento com rápido desenvolvimento do cérebro e da espinha dorsal. Também, outros órgãos internos estão começando a funcionar. Os nascituros do G8 incluíram 12 animais sendo 4 deles natimortos. Dentre os natimortos, 1 mostrou infecção cerebral por MAYV. Estes resultados observados no G8 são similares aos do G7. Entretanto uma dos camundongos fêmeas do G8 não conseguiu parir e foi eutanasiada. As placentas de fetos oriundos desta camundonga estavam todas infectada com MAYV e 44% dos fetos exibiam infecção cerebral por MAYV. Um dos natimortos exibia cabeça aumentada por hidrocefalia.

Comparando os nascituros do grupo G3, em que os animais eram infectados por MAYV no início, G7 no período mediano e G8 ao final da gestação observamos uma frequência similar de natimortos, e o encontro de genomas do MAYV apenas em cérebros, também, foi similar. Nossos achados de fetos infectados com MAYV apenas em cérebro e não em outros órgãos poderiam sugerir um tropismo deste vírus pelo sistema nervoso em formação destes animais. Um, estudo de 2021 mostrou que progenitores neurais humanos (hNPCs), pericitos e astrócitos são suscetíveis à infecção por MAYV, resultando na produção de partículas virais infecciosas. Os autores descrevem como o primeiro trabalho a avaliar o neurotropismo potencial do MAYV (BENGUE et al., 2021). Também, evidências da infecção por MAYV encontradas no sistema nervoso central dos fetos e natimortos, corroboram achados descrevendo sobre infecções por CHIKV ocasionalmente associadas a complicações neurológicas graves (GÉRARDIN et al., 2014).

Conclui-se, portanto, que a infecção pelo *alphavirus* Mayaro diferindo daquela por CHIKV onde a maioria dos seus casos graves com os fetos infectados no período do

periparto, nosso trabalho mostra que infecções por MAYV ocorrem de forma grave em toda a gestação (AL-QAHTANI et al., 2007; CAUCHEMEZ et al., 2016; GÉRARDIN et al., 2014; VASANI et al., 2016).

Analisando as placentas dos grupos G1, G2 e G4 (com placenta em formação) em que as infecções dos camundongos fêmeas ocorreram no início da gestação, G6 no período mediano e G8 ao final da gestação, observamos similaridade nos teores de MAYV entre todos os grupos que eram significativamente diferentes das placentas do G4 em que a viremia era mais elevada. Acreditamos que as placentas em formação no G4, com atraso no desenvolvimento e formação do labirinto, facilitaram a infecção placentária grave por MAYV com comprometimento no desenvolvimento fetal.

Analisando os órgãos fetais dos grupos G1, G2 e G4 (com placenta em formação) em que as infecções dos camundongos fêmeas ocorreram no início da gestação, G6 no período mediano e G8 ao final da gestação, também, observamos similaridade nos teores de MAYV entre todos os grupos que eram significativamente diferentes daqueles órgãos do G4 em que a viremia era mais elevada. Entretanto os teores de MAYV em órgãos mostraram-se menos elevados quando comparados aos das placentas.

Em suma, neste trabalho, mostramos um modelo de infecção gestacional em camundongos imunocompetentes que se mostrou viável e pode ser utilizado em estudos com outros vírus para estudos de fisiopatologia, rotas de infecção e outros como a ocorrência de efeitos teratogênicos nos neonatos. Este trabalho, também, alerta para um possível potencial neurotrópico do MAYV. Ainda, o trabalho traz interrogações sobre quais células da placenta são susceptíveis a sua infecção e como vírus migra pelo órgão chegando ao feto em desenvolvimento embrionário. O trabalho estimula novos estudos sobre a infecção congênita pelo Mayaro, um vírus emergente que poderá vir a ter grande importância em saúde pública no Brasil.

## 7. CONCLUSÃO

O modelo experimental de infecção congênita por vírus Mayaro em camundongos é viável e pode ser reproduzido em estudos com outros vírus.

O vírus Mayaro é transmitido por via transplacentária em camundongos C57BL/6j causando infecções congênitas graves.

O vírus Mayaro infecta e por via transplacentária acomete os fetos murinos em diferentes fases da gestação.

## 8. REFERÊNCIAS

AITKEN T. H., ET AL. MAYARO VIRUS ISOLATED FROM A TRINIDADIAN MOSQUITO, *MANSONIA VENEZUELENSIS*. **SCIENCE**. v. 131, N. 3405, p. 986, 1960.

AMARILLA, A. A. ET AL. CHIMERIC VIRUSES BETWEEN ROCIO AND WEST NILE: THE ROLE FOR ROCIOPRM-E PROTEINS IN VIRULENCE AND INHIBITION OF INTERFERON-A/B SIGNALING. **SCIENTIFIC REPORTS**. v. 7, 2017.

ANDERSON, C. R. ET AL. A. MAYARO VIRUS: A NEW HUMAN DISEASE AGENT. II. ISOLATION FROM BLOOD OF PATIENTS IN TRINIDAD. *AM. J. TROP. MED. HYG.* v. 6, N. 6, p. 1012–1016, 1957.

AASKOV, J. G. et al. Effect on Mice of Infection During Pregnancy with Three Australian Arboviruses. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 30, n. 1, p. 198–203, 1 jan. 1981.

AGARWAL, A.; PARIDA, M.; DASH, P. K. Impact of transmission cycles and vector competence on global expansion and emergence of arboviruses. **Reviews in Medical Virology**, 30 ago. 2017.

AGUILAR-LUIS, M. A. et al. An emerging public health threat: Mayaro virus increases its distribution in Peru. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 92, p. 253–258, 1 mar. 2020.

AJAMMA, Y. U. et al. Vertical transmission of naturally occurring Bunyamwera and insect-specific flavivirus infections in mosquitoes from islands and mainland shores of Lakes Victoria and Baringo in Kenya. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 12, n. 11, p. e0006949, nov. 2018.

AL-QAHTANI, A. A. et al. Review Zika virus : a new pandemic threat. 2007.

ANDERSON, C. R. et al. Mayaro Virus: A New Human Disease Agent: II. Isolation from Blood of Patients in Trinidad, B.W.I. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 6, p. 1012–1016, 1 nov. 1957.

ASSUNCAO-MIRANDA, I.; CRUZ-OLIVEIRA, C.; DA POIAN, A. T. Molecular mechanisms involved in the pathogenesis of alphavirus-induced arthritis. **Biomed Res Int**, v. 2013, p. 973516, 2013.

AUGUSTE, A. J. et al. Evolutionary and Ecological Characterization of Mayaro Virus Strains Isolated during an Outbreak, Venezuela, 2010. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1742–1750, out. 2015.

AURITI, C. et al. Pregnancy and viral infections: Mechanisms of fetal damage, diagnosis and prevention of neonatal adverse outcomes from cytomegalovirus to SARS-CoV-2 and Zika virus. **Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Basis of Disease**, v. 1867, n. 10, p. 166198, 1 out. 2021.

AZEVEDO, R. S. S. et al. Mayaro Fever Virus, Brazilian Amazon. **Emerging Infectious Diseases**, v. 15, n. 11, p. 1830–1832, nov. 2009.

BATISTA, P. M. et al. Detection of arboviruses of public health interest in free-living New World primates (*Sapajus* spp.; *Alouatta caraya*) captured in Mato Grosso do Sul, Brazil. **Revista Da Sociedade Brasileira De Medicina Tropical**, v. 46, n. 6, p. 684–690, 2013.

BAUER, M. K. et al. Fetal growth and placental function. **Molecular and Cellular Endocrinology**, v. 140, n. 1–2, p. 115–120, 25 maio 1998.

BELLISARIO, V. et al. Maternal high-fat diet acts as a stressor increasing maternal glucocorticoids' signaling to the fetus and disrupting maternal behavior and brain activation in C57BL/6J mice. **Psychoneuroendocrinology**, v. 60, p. 138–150, out. 2015.

BENGUE, M. et al. Mayaro Virus Infects Human Brain Cells and Induces a Potent Antiviral Response in Human Astrocytes. **Viruses**, v. 13, n. 3, p. 465, 11 mar. 2021.

BERGREN, N. A. et al. Laboratory demonstration of the vertical transmission of Rift Valley fever virus by *Culex tarsalis* mosquitoes. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 15, n. 3, p. e0009273, mar. 2021.

BHATT, S. et al. The global distribution and burden of dengue. **Nature**, v. 496, n. 7446, p. 504–507, 2013.

BRAJON, S. et al. All the Pups We Cannot See: Cannibalism Masks Perinatal Death in Laboratory Mouse Breeding but Infanticide Is Rare. **Animals : an Open Access Journal from MDPI**, v. 11, n. 8, p. 2327, 6 ago. 2021.

BUSTIN, S. A. et al. The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. **Clinical Chemistry**, v. 55, n. 4, p. 611–622, abr. 2009.

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**, v. 16, n. 6, p. 653–660, jun. 2016.

CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: A retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.

CDC. **Pregnant and Recently Pregnant People**. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/coronavirus/2019-ncov/need-extra-precautions/pregnant-people.html>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

CHARLIER, C. et al. Arboviruses and pregnancy: maternal, fetal, and neonatal effects. **The Lancet Child & Adolescent Health**, v. 1, n. 2, p. 134–146, 1 out. 2017.

CHENG, J. et al. Progress on the Role of Estrogen and Progesterone Signaling in Mouse Embryo Implantation and Decidualization. **Reproductive Sciences**, v. 30, n. 6, p. 1746–1757, 1 jun. 2023.

CHU, H. Y.; ENGLUND, J. A. Maternal Immunization. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 59, n. 4, p. 560–568, 15 ago. 2014.

CIOTA, A. T. et al. Vertical Transmission of Zika Virus by *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* Mosquitoes. **Emerging Infectious Diseases**, v. 23, n. 5, p. 880–882, maio 2017.

CRUZ-NOLASCO, M. et al. Evidence of vertical transmission and co-circulation of chikungunya and dengue viruses in field populations of *Aedes aegypti* ( L .) from Guerrero , Mexico. p. 4–7, 2015.

DAHL, E. et al. Vertical Transmission of Sindbis Virus in *Culex* Mosquitoes. **Viruses**, v. 14, n. 9, p. 1915, 30 ago. 2022.

DUARTE, E. A. et al. RNA virus quasispecies: significance for viral disease and epidemiology. **Infectious Agents and Disease**, v. 3, n. 4, p. 201–214, ago. 1994.

ESPOSITO, D. L. A.; FONSECA, B. A. L. DA. Will Mayaro virus be responsible for the next outbreak of an arthropod-borne virus in Brazil? **The Brazilian Journal of Infectious Diseases: An Official Publication of the Brazilian Society of Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. 540–544, 2017.

FIGUEIREDO, M. L. G. DE; FIGUEIREDO, L. T. M. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 47, p. 677–683, dez. 2014.

FIGUEIREDO, L. T. M. et al. Study of two different enzyme immunoassays for the detection of Mayaro virus antibodies. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 84, p. 303–307, set. 1989.

FIGUEIREDO, R. M. P. D. et al. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 37, n. 6, p. 476–479, dez. 2004.

FORSHEY, B. M. et al. Arboviral Etiologies of Acute Febrile Illnesses in Western South America, 2000–2007. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 4, n. 8, p. e787, 10 ago. 2010.

GALINDO, P. et al. An Ecological Survey for Arboviruses in Almirante, Panama, 1959–1962. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 15, n. 3, p. 385–400, 1 maio 1966.

GÉRARDIN, P. et al. Neurocognitive Outcome of Children Exposed to Perinatal Mother-to-Child Chikungunya Virus Infection: The CHIMERE Cohort Study on Reunion Island. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. e2996, 17 jul. 2014.

GOSDIN, L. et al. Six-Month Outcomes of Infants Born to People With SARS-CoV-2 in Pregnancy. **Pediatrics**, v. 150, n. 6, p. e2022059009, 1 nov. 2022.

GROUT, H.; MORALES, A.; VIDALES, H. Virus isolations from forest mosquitoes in San Vicente de Chucuri, Colombia. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 10, n. 3, p. 397–402, 1961.

HALSEY, E. S. et al. Mayaro Virus Infection, Amazon Basin Region, Peru, 2010–2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 19, n. 11, p. 1839–1842, nov. 2013.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HANSON, R. P. An Epizootic of Equine Encephalomyelitis That Occurred in Massachusetts in 1831. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 6, n. 5, p. 858–862, 1 set. 1957.

HASSING, R.-J. et al. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **Journal of Infection**, v. 61, n. 4, p. 343–345, 1 out. 2010.

HONÓRIO, N. A. et al. Experimental Vertical Transmission of Chikungunya Virus by Brazilian and Florida *Aedes Albopictus* Populations. **Viruses**, v. 11, n. 4, p. 353, 17 abr. 2019.

HOTEZ, P. J.; MURRAY, K. O.; BUEKENS, P. The Gulf Coast: A New American Underbelly of Tropical Diseases and Poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 5, p. e2760, 15 maio 2014.

IZURIETA, R. O. et al. Assessing Yellow Fever Risk in the Ecuadorian Amazon. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 1, n. 1, p. 7–13, 2009.

IZURIETA, R. O. et al. Hunting in the Rainforest and Mayaro Virus Infection: An emerging Alphavirus in Ecuador. **Journal of Global Infectious Diseases**, v. 3, n. 4, p. 317–323, 2011.

KROKOVSKY, L. et al. Dynamic of Mayaro Virus Transmission in *Aedes aegypti*, *Culex quinquefasciatus* Mosquitoes, and a Mice Model. **Viruses**, v. 15, n. 3, p. 799, 21 mar. 2023.

**Lançamento atual da taxonomia ICTV | ICTV.** Disponível em: <<https://ictv.global/taxonomy>>. Acesso em: 5 abr. 2023.

LANE-PETTER, W. Cannibalism in rats and mice. **Proceedings of the Royal Society of Medicine**, v. 61, n. 12, p. 1295–1296, 12 dez. 1968.

LANGSJOEN, R. M. et al. Eastern Equine Encephalitis Virus Diversity in Massachusetts Patients, 1938-2020. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 109, n. 2, p. 387–396, 2 ago. 2023.

LEMANT, J. et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the reunion island outbreak in 2005-2006. **Critical Care Medicine**, v. 36, n. 9, p. 2536–2541, 2008.

LENGLET, Y. et al. [Chikungunya infection in pregnancy: Evidence for intrauterine infection in pregnant women and vertical transmission in the parturient. Survey of the Reunion Island outbreak]. **Journal De Gynecologie, Obstetrique Et Biologie De La Reproduction**, v. 35, n. 6, p. 578–583, out. 2006.

LI, Q. H.; KIM, K.; SHRESTA, S. Mouse models of Zika virus transplacental transmission. **Antiviral Research**, Special Issue in Honor of Dr. Mike Bray on his retirement as the Editor-in-Chief of Antiviral Research. v. 210, p. 105500, 1 fev. 2023.

LICHINCHI, G. et al. Short Article Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Short Article Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Stem Cell**, p. 1–8, 2016.

LWANDE, O. W. et al. Global emergence of Alphaviruses that cause arthritis in humans. **Infection Ecology & Epidemiology**, v. 5, p. 29853, 2015.

MOTA, M. T. DE O. et al. Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10, n. 9, p. 1109–1122, set. 2015.

MUÑOZ, M.; NAVARRO, J. C. Virus Mayaro: un arbovirus reemergente en Venezuela y Latinoamérica. **Biomédica**, v. 32, n. 2, p. 288–302, 30 jun. 2012.

NAVARRETE-ESPINOSA, J.; GÓMEZ-DANTÉS, H. Arbovirus Causing Hemorrhagic Fever at IMSS. **Revista Médica del Instituto Mexicano del Seguro Social**, v. 44, n. 4, p. 347–353, 2006.

NAYAR, J. K.; ROSEN, L.; KNIGHT, J. W. Experimental vertical transmission of Saint Louis encephalitis virus by Florida mosquitoes. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 35, n. 6, p. 1296–1301, nov. 1986.

NEELAM, V. et al. Pregnancy and infant outcomes by trimester of SARS-CoV-2 infection in pregnancy–SET-NET, 22 jurisdictions, January 25, 2020–December 31, 2020. **Birth Defects Research**, v. 115, n. 2, p. 145–159, 2023.

NELMS, B. M. et al. Experimental and natural vertical transmission of West Nile virus by California Culex (Diptera: Culicidae) mosquitoes. **Journal of Medical Entomology**, v. 50, n. 2, p. 371–378, mar. 2013.

NEWTON, S. M. et al. Preterm birth among pregnant persons with severe acute respiratory syndrome Coronavirus 2 infection. **Journal of Perinatology**, v. 42, n. 10, p. 1328–1337, out. 2022.

NUNES, M. R. T. et al. Eco-epidemiologia dos arbovírus na área de influência da rodovia Cuiabá-Santarém (BR 163), Estado do Pará, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 25, p. 2583–2602, dez. 2009.

OLSEN, E. O. et al. SARS-CoV-2 infections among neonates born to pregnant people with SARS-CoV-2 infection: Maternal, pregnancy and birth characteristics. **Paediatric and Perinatal Epidemiology**, v. 36, n. 4, p. 476–484, 2022.

- PAIXAO, E. S. et al. Dengue in pregnancy and maternal mortality: A cohort analysis using routine data. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, 1 dez. 2018.
- PAUVOLID-CORRÊA, A. et al. Neutralising antibodies for Mayaro virus in Pantanal, Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 110, n. 1, p. 125–133, fev. 2015.
- PEINADO, R. DOS S. et al. A Review of Omics Studies on Arboviruses: Alphavirus, Orthobunyavirus and Phlebovirus. **Viruses**, v. 14, n. 10, p. 2194, 5 out. 2022.
- PINHEIRO, F. DE P. Situação das arboviroses na Região Amazônica. 1980.
- PLATT, D. J. et al. Zika virus-related neurotropic flaviviruses infect human placental explants and cause fetal demise in mice. **Science translational medicine**, v. 10, n. 426, p. eaao7090, 31 jan. 2018.
- RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J. COVID-19 and Pregnancy. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 36, n. 2, p. 423–433, jun. 2022.
- REGLA-NAVA, J. A. et al. Cross-reactive Dengue virus-specific CD8+ T cells protect against Zika virus during pregnancy. **Nature Communications**, v. 9, p. 3042, 2 ago. 2018.
- ROMEIRO, M. F. et al. Serological evidence of Mayaro virus infection in blood donors from São Carlos, São Paulo, Brazil. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 114, n. 9, p. 693–696, 1 set. 2020.
- ROSA, R. B. et al. Mouse Models of Mayaro Virus. **Viruses**, v. 15, n. 9, p. 1803, 24 ago. 2023.
- SALOMÃO, N. et al. Spontaneous Abortion and Chikungunya Infection: Pathological Findings. **Viruses**, v. 13, n. 4, p. 554, 25 mar. 2021.
- SCHAEFFER, M. et al. Epidemic Jungle Fevers Among Okinawan Colonists in the Bolivian Rain Forest: I. Epidemiology. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 8, n. 3, p. 372–396, 1 maio 1959.
- SEYMOUR, C.; PERALTA, P. H.; MONTGOMERY, G. G. Serologic Evidence of Natural Togavirus Infections in Panamanian Sloths and Other Vertebrates. **The**

**American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 32, n. 4, p. 854–861, 1 jul. 1983.

SLEGERS, C. A. D. et al. Persisting arthralgia due to Mayaro virus infection in a traveler from Brazil: is there a risk for attendants to the 2014 FIFA World Cup? **Journal of Clinical Virology: The Official Publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 60, n. 3, p. 317–319, jul. 2014.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiological reviews**, v. 58, n. 3, p. 491–562, 1994.

TALARMIN, A. et al. Mayaro virus fever in French Guiana: Isolation, identification, and seroprevalence. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 59, p. 452–6, 1 out. 1998.

TESH, R. B. et al. Mayaro virus disease: an emerging mosquito-borne zoonosis in tropical South America. **Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America**, v. 28, n. 1, p. 67–73, jan. 1999.

TESH, R. B. et al. Experimental Transmission of Mayaro Virus by *Aedes aegypti*. **The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 85, n. 4, p. 750–757, 1 out. 2011.

THEILACKER, C. et al. Prolonged polyarthralgia in a German traveller with Mayaro virus infection without inflammatory correlates. **BMC Infectious Diseases**, v. 13, p. 369, 8 ago. 2013.

TIEN DAT, T. et al. Dengue fever during pregnancy. **Nagoya Journal of Medical Science**, v. 80, n. 2, p. 241–247, maio 2018.

TORRES, J. R. et al. Family Cluster of Mayaro Fever, Venezuela. **Emerging Infectious Diseases**, v. 10, n. 7, p. 1304–1306, jul. 2004.

TOURET, Y. et al. Transmission materno-fœtale précoce du virus Chikungunya. **La Presse Médicale**, v. 35, n. 11, Part 1, p. 1656–1658, 1 nov. 2006.

VAN BLERKOM, L. M. Role of viruses in human evolution. **American Journal of Physical Anthropology**, v. Suppl 37, n. Suppl, p. 14–46, 2003.

VASANI, R. et al. Congenital Chikungunya--A Cause of Neonatal Hyperpigmentation. **Pediatric Dermatology**, v. 33, n. 2, p. 209–212, 2016.

VASCONCELOS, P. F. C. et al. Inadequate management of natural ecosystem in the Brazilian Amazon region results in the emergence and reemergence of arboviruses. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 17, p. S155–S164, 2001.

VODUŠEK, V. F. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. p. 1–8, 2016.

WAGGONER, J. J. et al. Real-Time RT-PCR for Mayaro Virus Detection in Plasma and Urine. **Journal of clinical virology : the official publication of the Pan American Society for Clinical Virology**, v. 98, p. 1–4, jan. 2018.

WEAVER, S. C.; LECUIT, M. Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 372, n. 13, p. 1231–1239, 26 mar. 2015.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and Future Arboviral Threats. **Antiviral research**, v. 85, n. 2, p. 328, fev. 2010.

WOODS, L.; PEREZ-GARCIA, V.; HEMBERGER, M. Regulation of Placental Development and Its Impact on Fetal Growth-New Insights From Mouse Models. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, p. 570, 2018.

WOODWORTH, K. R. Birth and Infant Outcomes Following Laboratory-Confirmed SARS-CoV-2 Infection in Pregnancy — SET-NET, 16 Jurisdictions, March 29–October 14, 2020. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 69, 2020.

YANG, L. et al. Innate immune signaling in trophoblast and decidua organoids defines differential antiviral defenses at the maternal-fetal interface. **eLife**, v. 11, p. e79794, [s.d.].

YOUNG, P. R. Arboviruses: A Family on the Move. Em: HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. G. (Eds.). **Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies**. livros Avanços em Medicina Experimental e Biologia. Singapore: Springer, 2018. p. 1–10.

ZUCHI, N. et al. Molecular detection of Mayaro virus during a dengue outbreak in the state of Mato Grosso, Central-West Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 109, n. 6, p. 820–823, set. 2014.

## ANEXO I



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto



São Paulo, 29 de Agosto de 2023

Ilmo(a)

**Dr(a). Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**

Certificamos que a proposta intitulada "**avaliação da capacidade de transmissão vertical pelo vírus Mayaro em modelo gestacional murino**", registrada com o nº **1191/2023**, sob a responsabilidade de **Luiz Tadeu Moraes Figueiredo**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica (ou ensino), encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **APROVADA** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do/a Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, em reunião realizada em 29 de Agosto de 2023.

Vigência da Autorização: 12/09/2023 a 12/09/2025						
Finalidade	Pesquisa					
Espécie	Linhagem	Idade	Peso	Quantidade		
				M	F	M+F
Camundongo	C57BL/6j	6 semanas	25.0 g	10	32	42
Camundongo	C57BL/6j	0 dias	1.0 g	0	224	224
Origem: biotério - Instalação Animal da Prefeitura da USP do Campus de Ribeirão Preto				<b>TOTAL</b>	266	

Atenciosamente,

Prof. Dr. Luiz Carlos Carvalho Navegantes  
Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa

Prof. Dra. Juliana Meola Lovato  
Vice-Coordenador/a da Comissão de Ética no Uso de Animais em Pesquisa