

# ANÁLISES HISTOPATOLÓGICAS E ULTRAESTRUTURAIS DE PULMÃO DE MODELO MURINO IMUNOCOMPETENTE INFECTADO PELO VÍRUS ZIKA

Fernando Brito Moreira Cesar, Derick Mendes Bandeira, Marcos Antonio Alvino da Silva, Arthur da Costa Rasinhas, Gabriela Cardoso Caldas, Fernanda Cunha Jácome, Ana Luísa Teixeira de Almeida, Debora Ferreira Barreto-Vieira

## Introdução

O vírus Zika (ZIKV) é considerado uma arbovirose emergente transmitida através de mosquitos do gênero *Aedes*. Foi descoberto em 1947 em Uganda, contudo veio a atrair maior atenção da comunidade científica com a epidemia ocorrida no Brasil em 2015, quando foi associado a infecção quadros clínicos mais graves como a microcefalia e a síndrome de Guillain-Barré.

Consequentemente, grande parte das pesquisas são recentes (menos de 6 anos) e diversas questões ainda permanecem sem esclarecimento.

O objetivo desse trabalho é avaliar as principais alterações ocorridas em tecido pulmonar de modelo murino infectado, através da microscopia de campo claro.

## Material e Métodos

### Experimentação Animal

Utilizou-se 20 camundongos BALB/c, machos, de dois meses de idade que foram inoculados com amostra do ZIKV numa diluição de  $10^4$  TCID<sub>50</sub>/100 $\mu$ L.

Os animais infectados foram separados em três grupos de cinco indivíduos cada e eutanasiados aos três, sete e quatorze dias pós-inoculação. Os outros cinco camundongos foram usados como grupo controle.

Os pulmões foram fixados em uma solução de Millonig (pH = 7.4) por 48h e armazenados em uma solução de álcool 50%.

### Microscopia de Campo Claro

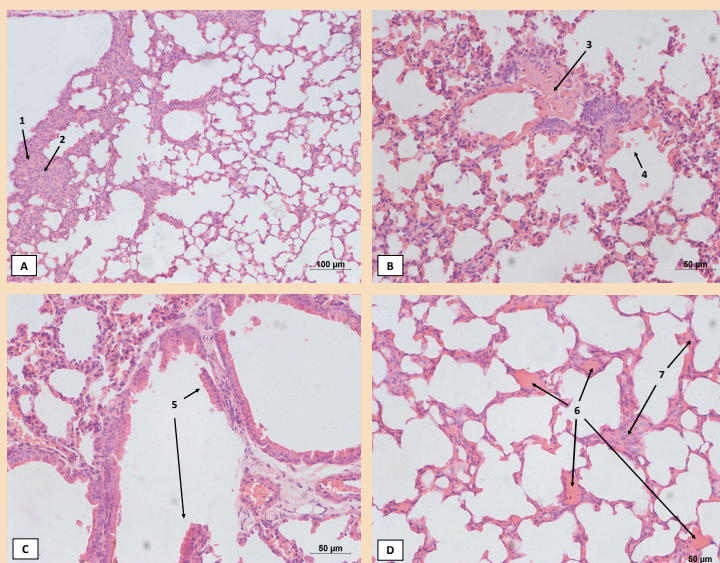
Foram clivadas amostras do pulmão e, então, embocadas em parafina, seccionadas e coradas com hematoxilina objetivando análises por microscopia de campo claro.

De cada lâmina, foram digitalizadas 30 imagens de campos distintos em uma magnificação de 200x e medidos 20 septos interalveolares aleatórios em cada campo, utilizando o software ImageJ (NIH).

No total, foram obtidas imagens de qualidade de 18 animais, o que totalizou 10.800 septos. Os valores das medições foram armazenados em um banco de dados para posterior análise estatística. A comparação dos grupos foi realizada através do teste de Mann-Whitney, sendo considerados significativos os valores de p menores que 0,05.

## Resultados

Dos 15 animais, cujos órgãos foram processados para confecção de lâminas para análise por microscopia de campo claro, 13 geraram material de boa qualidade para avaliação posterior. Os principais achados estão exibidos na **Figura 1**, onde é possível perceber que o ZIKV foi capaz de causar alterações no tecido pulmonar.



**Figura 1** – Alterações histopatológicas do pulmão de camundongos BALB/c infectados com ZIKV. A: Infiltrado inflamatório (1), alvéolos colabados (2). B: Edema (3), presença de hemácias no espaço bronquiolar (4). C: Descamação epitelial no bronquíolo (5). D: Congestão de diferentes vasos sanguíneos em um mesmo campo (6) e espessamento de septo alveolar (7).

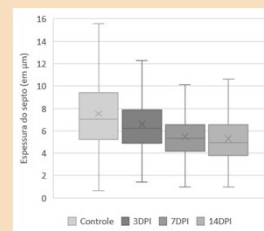
Na **tabela 1** é possível observar as alterações de acordo com o tempo pós-infecção. Chama a atenção o fato de o espessamento de septo ser encontrado em todos os pontos de avaliação e em todos os animais. Já o edema aumenta a sua frequência ao longo da cinética experimental. Descamação de epitélio, hemorragia e congestão são mais frequentemente encontrados no início da infecção, diminuindo sua importância nos períodos mais avançados. Contudo, nenhum animal veio a óbito devido a infecção pelo ZIKV, porém alguns deles mostraram grande agitação, eriçamento de pelos e prurido.

**Tabela 1** – Frequência das alterações histopatológicas encontradas em tecido pulmonar de camundongos BALB/c infectados por ZIKV nos tempos de 3, 7 e 14 dias pós-infecção.

| ALTERAÇÕES                            | 3DPI       | 7DPI       | 14DPI      |
|---------------------------------------|------------|------------|------------|
| Espessamento de septo                 | 5/5 (100%) | 4/4 (100%) | 4/4 (100%) |
| Dilatação alveolar compensatória      | 4/5 (80%)  | 4/4 (100%) | 2/4 (50%)  |
| Alvéolos colabados                    | 4/5 (80%)  | 4/4 (100%) | 3/4 (75%)  |
| Bronquíolo com descamação de epitélio | 4/5 (80%)  | 1/4 (25%)  | 0/4 (0%)   |
| Hemorragia no alvéolo ou bronquíolo   | 5/5 (100%) | 1/4 (25%)  | 0/4 (0%)   |
| Infiltrado inflamatório               | 5/5 (100%) | 3/4 (75%)  | 3/4 (75%)  |
| Edema                                 | 2/5 (40%)  | 2/4 (50%)  | 3/4 (75%)  |
| Congestão de vaso sanguíneo           | 5/5 (100%) | 3/4 (75%)  | 1/4 (25%)  |

**Legenda:** DPI – Dias pós-infecção

A espessura média de os septos dos alvéolos foram 7,51  $\mu$ m para os animais de controle e 6,56  $\mu$ m, 5,46  $\mu$ m e 5,31  $\mu$ m para os animais eutanasiados no terceiro, sétimo e décimo quarto dias após a inoculação, respectivamente. A diferença entre todos os grupos foi estatisticamente significativa ( $p < 0.00001$ ).



**Gráfico 1** – Espessura dos septos no grupo controle e nos tempos 3, 7 e 14 dias pós-infecção.

## Conclusão

Os resultados mostram que, apesar dos fracos sinais clínicos induzidos pelo vírus, importantes alterações subclínicas podem ocorrer. Observamos também que o espessamento focal do septo alveolar não foi suficiente para causar sinais clínicos respiratórios e a diminuição nos valores de medição dos septos podem ser uma evidência de um processo compensatório.

É necessária uma investigação mais aprofundada das alterações histopatológicas causadas pela infecção por ZIKV em modelo murino imunocompetente, bem como em seres humanos.

## Agradecimentos



**Tabela 2**

| Tema   | Link   |
|--|--|
| É realmente necessário usar animais em pesquisas científicas?      | <a href="http://bit.ly/3r93DHD">bit.ly/3r93DHD</a> |
| Por que o <i>Aedes aegypti</i> consegue transmitir tantas doenças? | <a href="http://bit.ly/3AHOa5b">bit.ly/3AHOa5b</a> |