

Ana Carolina Gonçalves de Carvalho

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Zika: avanços e perspetivas futuras” referentes à Unidade Curricular “Estágio”, sob orientação da Dra. Mónica Pereira, da Dra. Sara Augusto e da Professora Doutora Paula Cristina Luxo e apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas públicas de Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas

Setembro 2018



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

Bibliografia da capa

FELLNER, C. **Zika Virus: Anatomy of a Global Health Crisis**. *P T 41*, (2016) 242–53

**Zika virus scientific illustrations** - Visual Science. Available at: <https://www.visualscience.com/projects/zika/illustrations/>. (Accessed: 3rd September 2018)

Ana Carolina Gonçalves de Carvalho

Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Zika: avanços e perspetivas futuras ”  
referentes à unidade “Estágio Curricular” sob orientação da Dra. Mónica Pereira, Dra. Sara  
Augusto e da Professora Doutora Paula Cristina Luxo e apresentados à Faculdade de  
Farmácia da Universidade de Coimbra, para apreciação na prestação de provas múltiplas de  
Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas.

GYH/a Vfc '88%



UNIVERSIDADE DE COIMBRA

## **Declaração de Honra**

Eu, Ana Carolina Gonçalves de Carvalho, estudante do Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas, com o nº 2013152785, declaro assumir toda a responsabilidade pelo conteúdo do Documento Relatórios de Estágio e Monografia intitulada “Zika: avanços e perspectivas futuras” apresentados à Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra, no âmbito da unidade de Estágio Curricular.

Mais declaro que este Documento é um trabalho original e que toda e qualquer afirmação ou expressão, por mim utilizada, está referenciada na Bibliografia, segundo os critérios bibliográficos legalmente estabelecidos, salvaguardando sempre os Direitos de Autor, à exceção das minhas opiniões pessoais.

Coimbra, 5 setembro de 2018.

Ana Carolina Gonçalves de Carvalho

(Ana Carolina Gonçalves de Carvalho)

## AGRADECIMENTOS

À equipa do laboratório de Controlo de Qualidade de Microbiologia na indústria onde estagiei, agradeço toda a disponibilidade e todos os conhecimentos transmitidos ao longo do estágio, bem como à própria empresa mãe a possibilidade de ter proporcionado um estágio tão importante no meu percurso curricular.

Agradeço à Farmácia Viriato e à sua equipa técnica por toda a amabilidade, disponibilidade, amizade e simpatia com que me receberam. Ter integrado uma equipa tão dinâmica foi sem dúvida um fator essencial para a realização de um estágio ainda mais gratificante. Um obrigada especial à minha orientadora, Dr<sup>a</sup>. Sara Augusto, por toda a amizade e confiança depositadas em mim durante a orientação do meu estágio.

Um muito obrigada à Professora Doutora Paula Cristina Luxo, pela orientação e acompanhamento durante a realização desta monografia.

A todos os meus amigos e família agradeço sinceramente por toda a ajuda, paciência e companheirismo. Obrigada por me aturarem nos momentos mais difíceis e por sempre me encorajarem.

E por último agradecer aos meus pais, pela paciência, amizade, incentivo e apoio incondicionais. Por nunca me deixarem desistir e por serem a força motriz do meu percurso académico. É graças a vocês e por vocês que aqui estou. Um muito obrigada.

A todas as pessoas que de alguma forma me ajudaram a chegar até aqui, **obrigada!**

## ÍNDICE

<b>PARTE I - RELATÓRIOS DE ESTÁGIO</b> .....	I
Lista de Abreviaturas .....	2
<b>RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA FARMACÊUTICA</b> .....	3
<b>1. Introdução</b> .....	4
<b>2. Análise SWOT</b> .....	5
<b>2.1 Pontos Fortes</b> .....	5
<b>2.2. Pontos Fracos</b> .....	6
<b>2.3. Oportunidades</b> .....	7
<b>2.4. Ameaças</b> .....	8
<b>3. Considerações Finais</b> .....	9
<b>RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA</b> .....	11
<b>2. Análise SWOT</b> .....	13
<b>2.1 Pontos Fortes</b> .....	13
<b>2.2 Pontos Fracos</b> .....	15
<b>2.3 Oportunidades</b> .....	16
<b>2.4 Ameaças</b> .....	17
<b>3. Considerações Finais</b> .....	19
<b>Referências Bibliográficas</b> .....	23
<b>PARTE II - MONOGRAFIA</b> .....	25
<b>Zika: avanços e perspectivas futuras</b> .....	26
Lista de Abreviaturas.....	27
<b>RESUMO</b> .....	29
<b>ABSTRACT</b> .....	31
<b>1. Introdução</b> .....	33
<b>2. Estrutura do Vírus</b> .....	34
<b>3. Infecção por vírus Zika</b> .....	35
<b>3.1 Infecção materna</b> .....	37
<b>3.2 Modelos Animais da Infecção</b> .....	38
<b>4. Replicação</b> .....	39
<b>5. Resposta imunológica ao vírus</b> .....	40

5.1 Imunidade inata e imunidade mediada por células.....	40
5.2 Imunidade humoral e de outros flavivírus.....	40
6. Manifestações clínicas da doença.....	42
6.1 Complicações associadas à infecção por zika.....	42
6.2 Síndrome de zika congénito.....	43
6.3 Manifestações em crianças expostas ao vírus.....	44
7. TRANSMISSÃO.....	45
7.1 Transmissão por vetor.....	45
7.2 Transmissão sexual.....	45
7.3 Transmissão vertical.....	46
7.4 Transmissão por transfusão de sangue.....	46
7.5 Transmissão por transplante de tecidos ou órgãos.....	46
7.6 Transmissão por outras vias.....	47
8. Diagnóstico.....	47
8.1 Amostras.....	47
8.2 Diagnóstico pré-natal.....	48
8.3 Diagnóstico neuroimagiológico.....	48
8.4 Isolamento do vírus.....	48
8.5 Ensaio moleculares.....	49
8.6 Ensaio Serológicos.....	49
9. Razões para ocorrência dos surtos.....	50
10. Medidas de Prevenção.....	51
10.1 Controlo de Vetores.....	51
10.2 Antivirais.....	53
10.2.1 Moléculas antivirais inibidoras.....	54
10.2.2 Anticorpos com potencial terapêutico para flavivírus.....	55
10.3 Vacinas.....	55
10.3.1 Estratégia de Desenvolvimento Clínico.....	55
10.3.2 Design do antigénio e abordagens para a entrega da vacina.....	56
10.3.3 Modelos de infecção humana controlada.....	56
10.3.4 Tipos de vacinas.....	57
11. Considerações Finais.....	61
Referências Bibliográficas.....	62

## **ÍNDICE DE FIGURAS**

Figura 1- Regiões geográficas onde o vírus zika é endémico e onde causou epidemias.....	33
Figura 2- Arquitetura do RNA genómico do vírus zika, localização, função e local de clivagem das proteínas .....	35
Figura 3- Maturação dos flavivírus ER- retículo endoplasmático, TGN- aparelho trans-golgi	39
Figura 4- Imagens de bebés com SZC.....	44
Figura 5- Estratégias de controlo do vetor para prevenir a transmissão de ZIKV .....	52

## **ÍNDICE DE TABELAS**

Tabela 1- Ensaio moleculares com autorização EUA para deteção de RNA viral de ZIKV.	49
Tabela 2- Ensaio serológicos com autorização EUA para deteção de Ac para ZIKV .....	49

# **PARTE I - RELATÓRIOS DE ESTÁGIO**

## Lista de Abreviaturas

CQ	Controlo de Qualidade
DCI	Denominação Comum Internacional
EC	Estágio Curricular
FC	Farmácia Comunitária
FFUC	Faculdade de Farmácia da Universidade de Coimbra
FQ	Físico-Química
FV	Farmácia Viriato
MICF	Mestrado Integrado em Ciências Farmacêuticas
MNSRM	Medicamento Não Sujeito a Receita Médica
PA	Princípio Ativo
PSM	Preparação Semanal da Medicação
PTG	Procedimentos Técnicos
SWOT	Strenghts, Weaknesses, Opportunities, Threats (em português Pontos Fortes, Pontos Fracos, Oportunidades e Ameaças)
TG	Triglicerídeos

**RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM INDÚSTRIA  
FARMACÊUTICA**

## I. Introdução

O estágio curricular, que faz parte do plano curricular do MICE, é a ligação que o aluno consegue ter com a vertente profissional do curso. É indiscutivelmente uma mais-valia para cimentar os conhecimentos adquiridos, aprender novos e acima de tudo ter contacto com a realidade profissional. A meu ver é uma parte essencial na aprendizagem não só de saberes mas também uma aprendizagem pessoal, que nos ajuda a preparar para a entrada no mundo do trabalho.

A indústria farmacêutica é uma vertente profissional muito marcada no nosso curso. É sempre importante experimentar uma saída profissional para o mercado de trabalho, principalmente numa área farmacêutica tão nobre como a indústria. Desde que entrei no curso, esta sempre foi a área que mais me fascinou. O farmacêutico, na indústria farmacêutica, pode ter muitos papéis, mas acima de tudo deve garantir o seguimento das boas práticas de fabricação e distribuição, as boas práticas laboratoriais, clínicas e de registo e o bom uso das suas capacidades técnicas e científicas. Especificamente no CQ, o papel do farmacêutico passa pela garantia da qualidade, segurança e eficácia de medicamentos e produtos de saúde.<sup>1</sup>

Apraz-me poder dizer que realizei um estágio de indústria, numa empresa de renome, conhecida por estar no topo da produção de produtos genéricos. Este decorreu entre 8 janeiro a 27 março, com o horário das 8.30h às 17.45h, perfazendo um total de 440h.

O estágio nesta empresa proporcionou-me um contacto com a tecnologia do medicamento, mais especificamente, no controlo de qualidade deste. A empresa está dividida em várias unidades consoante os produtos produzidos. O meu estágio decorreu na unidade 4, unidade da produção de cefalosporinas. Tive oportunidade de ficar na área do CQ microbiológico, que é uma vertente pouco abordada no nosso curso. E por ser pouco abordada e porventura também pouco conhecida, sinto que contribuiu bastante para o enriquecimento dos meus conhecimentos ao nível científico e prático. Nesta área de microbiologia era feito o CQ de todas as unidades da indústria.

Este relatório tem como objetivo fazer um resumo do meu percurso na indústria, concretizando o que julgo serem os *pontos fortes* e *fracos* deste meu estágio, passando também por referir *ameaças* e *oportunidades* encontradas, tudo integrado numa análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

## 2. Análise SWOT

### 2.1 Pontos Fortes

#### 2.1.1 Localização

A empresa faz parte de uma cadeia de empresas multinacionais e que opera num dos concelhos do distrito de Viseu. Como sou residente em Viseu, a proximidade ao local de estágio foi sem dúvida uma mais-valia, evitando grandes viagens e um cansaço acrescido.

#### 2.1.2 Contacto com uma equipa disponível com diferentes vertentes profissionais

Ao estagiar num laboratório de microbiologia deparei-me com uma equipa versátil, formada em diversas áreas profissionais como Biologia e Biotecnologia. Assim, foi-me permitido um conhecimento mais vasto da área visto haver conteúdos que me eram alheios e que foram prontamente explicados, facilitando a integração no laboratório. A integração nesta equipa foi facilitada pela pronta ajuda de profissionais que dela fazem parte e que foram inexcedíveis, contribuindo para que a minha aprendizagem e interesse fossem um desafio superado todos os dias.

#### 2.1.3 Contacto com material de laboratório

Uma das vantagens óbvias de estagiar num laboratório em indústria é o contacto com o material e aparelhos de laboratório. Na faculdade, devido ao elevado número de alunos por turma e reduzido número de aparelhos, não nos é permitido o manuseamento livre destes. Neste laboratório pude contactar, sem reservas, com todo o tipo de material diverso que faz normalmente parte de um laboratório, alguns dos quais do meu desconhecimento até então.

#### 2.1.4 Enriquecimento em conhecimentos não muito aprofundados

A área de Microbiologia não tem uma posição muito forte no programa curricular, havendo uma escassez de unidades curriculares que englobem esse tema. Por conseguinte a parte prática não é também uma componente muito trabalhada. Assim, o facto de ter estagiado neste laboratório abriu-me portas a um conhecimento que estava pouco aprofundado sobre a Microbiologia, não só de temas e procedimentos, mas também de aparelhos que nunca tinha visto antes, como o *Vitek MS* e *Vitek 2*

### 2.1.5 PTG que me foram facultados e rotatividade

Na primeira semana de estágio, são-nos facultados vários PTGs, de forma a nos podermos familiarizar com os procedimentos e técnicas realizadas no laboratório, servindo apenas de introdução básica ao trabalho realizado no laboratório. Durante todo o estágio podemos requisitá-los de forma a tirar dúvidas ou verificar detalhes e certas informações. Na duração do estágio tive a oportunidade de passar por várias bancadas de trabalho, como a identificação de microrganismos, leitura de placas de cultura, ensaios de endotoxinas, ensaios de *bioburden* entre outros. Posso assim afirmar que tomei conhecimento generalizado de todos os ensaios realizados no laboratório, o que contribuiu para um bom plano de estágio.

## 2.2. Pontos Fracos

### 2.2.1 Curto período de estágio

O estágio de indústria tem a duração de 3 meses. A área de CQ tem 2 laboratórios, o da físico-química e o da microbiologia. Comecei o meu estágio na Microbiologia com a ideia de, a meio deste, poder trocar para a FQ. Contudo isto não aconteceu. Até nos podermos familiarizar e ter confiança para os realizar, 1 mês e meio não chega. E portanto, devido à falta de tempo, tive que optar pela decisão de ficar os 3 meses na micro, isto porque preferi aprofundar uma área em detrimento de abordar apenas superficialmente as duas. Quando me sentia mais à vontade nesta área, estava já a concluir o estágio, pelo que não pude tomar conhecimento do que se passava na outra área. Ainda assim, não me arrependo de ter optado por ficar nesta área, pois foi gratificante e desafiante para mim a aprendizagem na microbiologia e que provavelmente não teria na outra área.

### 2.2.2. Parcos conhecimentos na área de microbiologia

No percurso curricular na FFUC, tive cadeiras da área da micro, como Microbiologia, Bacteriologia, Parasitologia e Virologia. Contudo, devido à extensão de conteúdos, apenas abordamos alguns temas superficialmente, contribuindo ao mesmo tempo, para que a parte prática também tivesse sido pouco desenvolvida.

Assim, ao deparar-me com uma área muito específica da Microbiologia, senti uma certa falta de preparação. Realizei e observei diversos procedimentos os quais nunca me tinham sido apresentados, como ensaio de endotoxinas, ensaios de *bioburden* e até mesmo de identificação de microrganismos. Os materiais, como meios de cultura líquidos e sólidos e reagentes, eram também grande parte desconhecidos. Isto acabou por tornar mais difícil a integração no laboratório, pois levou a uma certa inibição da minha parte, devido à insegurança nos temas abordados.

### 2.2.3. Algumas atividades desenvolvidas foram apenas de caráter observacional

Durante o primeiro mês e meio, todo o estágio foi principalmente observacional. Devido ao volume de trabalho e falta de disponibilidade de recursos humanos, não houve oportunidade para eu poder aplicar os conhecimentos na prática. Acabei portanto por ter pouca autonomia pois o pouco trabalho que realizasse tinha que ser sob a vigilância de alguém. Infelizmente, também devido ao reduzido tempo do estágio, nunca pude gozar de uma autonomia plena.

## 2.3. Oportunidades

### 2.3.1 Realidade no farmacêutico na indústria

Penso que o principal objetivo dos estágios é dar-nos uma oportunidade de observar o papel do farmacêutico no mercado de trabalho e dar-nos a hipótese de nos integrarmos com profissionais e perceber um pouco mais o que queremos fazer no futuro. A oportunidade de estagiar num laboratório é uma oportunidade única porque estamos no centro da ação que é o medicamento e mais concretamente no meu caso, o seu CQ. A posição do farmacêutico não é estática. Ao invés ela é de constante evolução de conhecimentos e procedimentos, o que ajuda a compreender onde nos inserimos e o que podemos fazer no futuro para a melhorar.

### 2.3.2 Constante evolução de conhecimento

Como já referi, aprende-se muito num estágio. Obviamente aprendizagem científica, pois não é apenas decorar e esquecer. Temos que pôr em prática muito conhecimento e para isso temos que o compreender em pleno. Também se aprende a interagir com os outros, pois trabalha-se em equipa, para um objetivo comum. A comunicação é uma parte muito importante num laboratório e é também um valor que se aprende rapidamente.

Além disso, sinto que a nível pessoal também aprendemos muito. A responsabilidade de horários, prazos, limites acaba por nos ser inculcada, de estarmos a fazer algo que sabemos ter que ser bem feito e que influencia várias pessoas ao início pesa, mas, acaba por se tornar algo que mais tarde fazemos naturalmente. Aqui o desafio constante é de querer fazer bem, não só por nós mas pelos outros também.

## **2.4. Ameaças**

### 2.4.1 Substituição da mão humana pela máquina

Uma das maiores ameaças ao papel do farmacêutico na indústria é a substituição da mão humana pela máquina. Ao longo do estágio tive a oportunidade de visitar duas áreas de produção, a da unidade 4 (produção de cefalosporinas) e da unidade 5 (produção de penicilinas). O que observei é que cada vez mais a mão humana não é necessária, pois há robôs capacitados para quase todas as atividades (ex. enchimento, embalamento e armazenamento). Assim, é da nossa responsabilidade aproveitar ao máximo algumas tarefas que não podem ser substituídas por máquinas e efetuar uma profícua fiscalização das tarefas dessas máquinas para que não haja quebras na cadeia e os procedimentos sejam feitos corretamente.

### 2.4.2 Falta de necessidade de um farmacêutico na área da microbiologia/CQ

Há cada vez mais pessoal de diversas áreas no CQ de indústria. Ao longo do curso somos preparados para a necessidade e importância de um farmacêutico no CQ, mas a realidade é que cada vez mais, há outros profissionais que podem também desempenhar esse papel. Sendo assim, penso que se avizinham tempos de concorrência com outros técnicos. O farmacêutico está gradualmente a perder o lugar no laboratório, ocupando mais posições de

gabinete. É uma área cada vez mais competitiva e de difícil acesso. Isso é uma situação assustadora para uma recém-licenciada e, portanto, algo em que me sinto ameaçada. Assim cada vez mais vai havendo várias pessoas qualificadas para as mesmas posições, o que faz com que nos tenhamos que destacar mais, com a necessidade de qualidades diferenciadoras, aproveitando ao máximo os nossos fatores críticos de sucesso.

### **3. Considerações Finais**

Começo por dizer que apesar de ainda ser incerto o que realizarei no futuro da minha carreira, a utilidade deste estágio é inquestionável. Posso dizer ainda que cresci muito como profissional, mas também como indivíduo. E penso que o estágio é para isso mesmo, pois a responsabilidade que sentimos aqui é muito superior.

Sendo honesta, o início deste estágio requereu grande adaptação. Nunca tendo contactado com uma indústria, todo o processo me pareceu assustador. Há uma grande comoção em volta dos comportamentos adequados dentro de um laboratório. Começando pelo facto de ter de trocar de roupa todos os dias, depois mais especificamente na Microbiologia andar de luvas e máscara e ter uma única rota de circulação para evitar contaminação. Tudo isto é complicado e complexo ao início. Mas devo admitir que ao fim de alguns dias passa a ser algo muito normal e rotineiro.

Todos os pontos fortes e oportunidades deste estágio permitiram uma aprendizagem, um explorar de conhecimentos. Estes tornaram o estágio mais compensador a todos os níveis, abrilhantaram os 3 meses e amenizaram os desafios. Todos os pontos fracos e ameaças, apesar de não terem melhorado ou facilitado o estágio, de certeza que permitiram um aperfeiçoamento pessoal e um melhoramento a nível profissional, pois é com os erros que se aprende.

Apesar não ter extraído apenas pontos positivos deste estágio, considero que retiro dele uma avaliação bastante positiva. Sinto que foi um estágio muito compensador, pois por todos os erros e complicações que enfrentava, faziam com que as vitórias fossem ainda mais celebradas e especiais.

Tenho a agradecer a todo o pessoal que me acompanhou, que teve paciência para as minhas dúvidas incessantes, para os meus erros descuidados, mas que também festejou comigo os meus pequenos passos neste novo desafio.

Acabo com uma nota muito importante: é necessário valorizar o papel do farmacêutico na indústria! Ao longo de todo o curso é-nos referenciado como um possível percurso o ingresso na indústria, mas não sei se é do conhecimento geral o papel que o farmacêutico verdadeiramente realiza neste setor. Numa altura em que os desafios são cada vez maiores, é da nossa responsabilidade e interesse tentar destacar-nos em várias áreas e desenvolver outras, tentando sempre melhorar o nosso papel na linha do medicamento e na saúde do público.

# **RELATÓRIO DE ESTÁGIO EM FARMÁCIA COMUNITÁRIA**

## I. Introdução

A conclusão do curso de MICF implica a realização de um Estágio Curricular (EC) final em Farmácia Comunitária (FC). A realização deste estágio funciona como método de consolidação de conhecimentos adquiridos, pondo em prática todos os ensinamentos, fruto das aprendizagens obtidas ao longo dos cinco anos de curso. O objetivo é colocarmo-nos mais perto do utente, conhecermos a realidade dos seus problemas e partilhar um pouco dos nossos ensinamentos, pois só tendo contacto direto com as situações quotidianas nos podemos tornar profissionais capazes e mais completos.

A FC é o primeiro ponto de contacto do utente em questões de saúde. É na farmácia que as pessoas podem encontrar uma variedade de medicamentos e produtos de saúde de forma a satisfazer as suas necessidades. Cabe então aos farmacêuticos demonstrar que possuem conhecimentos, disponibilidade, que têm confiança e acima de tudo dedicação e competência profissionais no exercício da sua atividade de cuidado da saúde do utente.<sup>3</sup> A farmácia, hoje em dia, é cada vez mais um local de promoção da saúde e de hábitos e estilos de vida saudáveis ao invés do que acontecia num passado recente, em que era apenas um espaço de dispensa de medicamentos.

O farmacêutico em FC é o agente de saúde com mais legitimidade para implementar o uso racional e correto do medicamento e promover a saúde pública, porque foi preparado para tal. É este que deve assegurar que a população recebe o máximo do benefício terapêutico no seu tratamento com medicação. O farmacêutico tem uma posição privilegiada para promover a saúde, ajudar no aconselhamento terapêutico e promover o bem-estar dos utentes. Para isso é essencial que este esteja no topo das suas capacidades técnicas e científicas.<sup>4</sup>

O meu estágio foi realizado na Farmácia Viriato, localizada em Viseu. Esta conta já com 62 anos de implantação e experiência nesta cidade, o que lhe permite uma presença bem definida na vida dos utentes, fruto de uma experiência adquirida e evolução constantes. O horário de funcionamento é das 8.30h às 23h de segunda a sábado. O meu estágio realizou-se de 2 de abril a 9 de julho, perfazendo um total de 661.5h, sob a orientação da Dra. Sara Raquel Lírio Sousa Augusto.

Este relatório vai relatar um pouco da minha experiência em FC, abordando os pontos fortes e fracos encontrados, as oportunidades e as ameaças enfrentadas, fazendo tudo isto com recurso a uma análise SWOT (*Strengths, Weaknesses, Opportunities, Threats*).

## 2. Análise SWOT

### 2.1 Pontos Fortes

#### 2.1.1 Boa Localização

A FV situa-se em Viseu, constituindo para mim uma mais-valia como residente nesta cidade. A farmácia esteve localizada muitos anos perto do monumento histórico do guerreiro Viriato, tendo mudado as suas instalações em 2009 para a localização atual. Agora, com instalações mais modernas, está perto de uma escola, superfície comercial e habitações, o que permite ter uma base de utentes regular. Em dias de feira semanal, é uma farmácia bem localizada para comerciantes e ponto de passagem, o que permitiu uma abordagem a utentes que habitualmente não contactam com unidades locais de saúde, podendo servir para esclarecimento de algumas dúvidas, administrar conselhos e, em alguns casos, encaminhar para um médico.<sup>5</sup> Está portanto bem localizada, beneficiando ainda de bons lugares de estacionamento para quem deles precise.

#### 2.1.2 Farmácia com pessoal jovem e dinâmico

A farmácia tem uma equipa jovem, muito disponível e dinâmica. A maior parte dos farmacêuticos e técnicos encontram-se a trabalhar há menos de 5 anos, o que tornou muito fácil a comunicação e a perceção do que poderiam ser as minhas maiores dificuldades. Foram sempre muito tolerantes às minhas dúvidas e estiveram sempre prontos a ajudar-me. Esta disponibilidade permitiu-me estar à vontade para colocar questões e pedir opiniões, evitando assim eventuais erros.

#### 2.1.3 Preparação de manipulados

Na FV, tive a oportunidade de realizar vários manipulados. Um medicamento manipulado é “qualquer fórmula magistral ou preparado oficial preparado e dispensado sob a responsabilidade de um farmacêutico”.<sup>6</sup> Como sabemos, estes são alternativas para quando não há medicação apropriada, especialmente em pediatria e uso veterinário, podendo haver alteração na forma farmacêutica ou dosagem. Por exemplo, o caso específico de crianças prematuras acontecia muito, pois a medicação não estava adequada ao seu peso ou à maturidade dos seus órgãos.

Esta farmácia tem uma vasta experiência na preparação de manipulados, o que não acontece com outras farmácias que eu conheço. Felizmente a FV dispõe de todas as condições necessárias para a preparação e manipulação, seguindo as normas estipuladas nas Boas Práticas de Medicamentos Manipulados.<sup>7</sup> Esta farmácia chegava a realizar manipulados por pedido para outras farmácias ou clínicas veterinárias. A manipulação, “conjunto de operações de carácter técnico, que englobam a elaboração da forma farmacêutica, a sua embalagem e o seu controlo” era realizada por duas colegas que estavam responsáveis por esta área.<sup>8, 9</sup>

No início comecei por observar e mais tarde, sob supervisão, comecei eu própria a preparar manipulados, o que constituiu um desafio enriquecedor para os meus conhecimentos. Realizei o preenchimento das folhas de registo do manipulado, a rotulação e por fim o preço.

#### 2.1.4 Plano de estágio

O meu estágio esteve dividido por etapas. Iniciei na área das Encomendas, onde tratava da receção e armazenamento das mesmas. O facto de a FV dispor de um robot, enriqueceu a minha aprendizagem em termos práticos, já que me permitiu ter a percepção de como se faz a ligação entre a receção e o atendimento. Nas encomendas, área fundamental por onde passam todos os medicamentos, ajudou-me bastante a fixar alguns nomes e associá-los aos PA. Mas esta etapa inicial não se cingiu à abertura de caixas com medicamentos; é que durante este tempo fui também observando atendimentos dos meus colegas e a maneira como eles atendiam e aconselhavam os utentes. O balcão na minha opinião, constitui o “teatro de operações” da FC. Fruto da minha experiência inicial no setor das encomendas, foi mais fácil a integração nas equipas de atendimento, contribuindo para o entrosamento e dinâmica do trabalho em equipa. Assim, quando finalmente estava sozinha ao balcão, sentia-me mais confiante e preparada para o atendimento.

#### 2.1.5 Serviços prestados ao utente na farmácia

Cada vez mais as farmácias se querem distinguir e diferenciar, demonstrando que a farmácia não serve só para dispensar medicamentos. No caso da FV é evidente o esforço por poder dar aos utentes uma variedade de serviços como maquilhagem profissional,

medições bioquímicas como triglicéridos (TG), ácido úrico e glicose, consultas de nutrição, medição da tensão arterial, vacinas e administração de injetáveis, furação de orelhas, massagem, fisioterapia, serviço de preparação semanal da medicação (PSM). Esta panóplia de serviços permitiu-me, como estagiária, estar em contacto com os diferentes aparelhos, apreender as várias técnicas e familiarizar-me mais com este tipo de atendimento. Notei que é nestes momentos mais íntimos que o utente expõe, com mais à vontade, as suas dúvidas e problemas. Assim, como desde o início observei os colegas a realizar estas consultas, permitiu-me ter uma melhor perceção do que devo perguntar e aconselhar.

#### **2.1.6 Única estagiária na farmácia**

A FV tem por hábito não ter mais do que um estagiário ao mesmo tempo. Considero isto uma mais-valia para mim como estagiária pois pude dispor do máximo de atenção e dedicação por parte de todo o pessoal. Assim o meu progresso foi acompanhado por todos, estando todos os colegas a par das minhas dificuldades e também dos avanços.

### **2.2 Pontos Fracos**

#### **2.2.1 Dificuldade em associar os nomes dos medicamentos ao P.A.**

Como qualquer estudante acabada de sair da faculdade, onde não lidamos com marcas comerciais, mas sim com princípios ativos, tive uma certa dificuldade em conseguir agilmente compreender para que situação servia cada medicamento. Isto tornava-se ainda mais visível quando o utente chegava ao balcão e pedia diretamente o nome do medicamento, ou chegava com a caixa e me pedia para dizer para que servia. Contudo, devo admitir que o facto de ter iniciado o meu estágio na receção de encomendas e armazenamento destas acabou por ajudar, pois apesar dos inúmeros produtos de diversos laboratórios e da sua heterogeneidade, foi suficiente para ir fixando alguns. Além disso, a maior parte dos médicos prescritores passam agora por DCI, o que ajuda na superação desta questão.

#### **2.2.2 Constrangimentos na “filtragem” da linguagem técnica para os utentes**

Devido à minha inexperiência, na parte inicial do estágio, encontrava-me, por vezes, numa situação em que, apesar de eu conhecer os termos técnicos, tinha algumas dificuldades em

transformá-los em linguagem corrente e perceptível para os utentes, de forma a que estes entendessem corretamente sem ficarem com qualquer tipo de dúvidas. Felizmente, foram poucos os casos em que tal sucedeu, já que, nesses casos fui prontamente ajudada por colegas que estavam mais perto.

## **2.3 Oportunidades**

### **2.3.1 Formações**

Durante este estágio em FC foi-me concedida a oportunidade de assistir a várias formações. (Anexo I) Estas formações foram realizadas dentro e algumas fora do espaço da farmácia, integrada em diversas atividades, o que me permitiu um conhecimento aprofundado dos produtos e várias abordagens possíveis ao aconselhamento. Devido à sazonalidade do meu estágio, tive inclusive formações sobre proteção solar, o que me ajudou a realizar aconselhamentos a utentes específicos e detalhados, ao mesmo tempo que ia aprofundado os conhecimentos sobre essa matéria.

### **2.3.3 Área dermocosmética muito desenvolvida**

A FV aposta muito fortemente na área de dermocosmética. Como apresenta muita variedade de gamas e marcas, permitiu-me um conhecimento aprofundado de diversos produtos e a suas indicações. Isto enriquece muito o nosso aconselhamento, o que é vital, pois é algo que não temos oportunidade de aprender na faculdade.

### **2.3.4 Farmácia muito dinâmica**

A FV tem uma equipa constituída por profissionais de saúde jovens, cheios de ideias e interesse na promoção de uma vida saudável. Isto permitiu-me ajudar na preparação de vários eventos, fomentando o meu pensamento criativo, e tentado associar uma boa promoção da saúde com atividades do agrado dos utentes.

Assim, durante a minha estadia nesta farmácia, foram realizadas inúmeras atividades com vista a ajudar os utentes em diversas áreas, como rastreio de insuficiência venosa, a semana da saúde numa escola secundária, tentando sensibilizar desde cedo para o cuidado na saúde.

Na escola secundária realizei, em colaboração com outros colegas, palestras sobre temas como alergias e acne; assim conseguíamos associar o nome da farmácia a um local de confiança, preocupação e dedicação à saúde pública. Na Feira de Tons de Primavera, onde colocámos à disposição os nossos serviços no âmbito da cosmética, nomeadamente maquilhagem e perfumes, mas também da dietética, solares e produtos de beleza masculinos (Anexo II), reunindo portanto eventos que tentaram ligar a farmácia como um local de saúde sem ser só a dispensa de medicamentos.

## **2.4 Ameaças**

### **2.4.1 Falta de confiança dos utentes**

Devido ao facto de ser estagiária, inicialmente era notória a falta de confiança que enfrentava quando tentava explicar alguma posologia ou indicação terapêutica da medicação, fruto de, por um lado ser ainda pouco conhecida na farmácia e, por outro, figurar na minha lapela a condição de estagiária. Aos poucos, os utentes mais assíduos da farmácia, começaram a entender e a familiarizar-se com a minha linguagem, o que levou a que este problema fosse atenuado, mesmo porque tinha sempre o apoio de um colega nas situações mais difíceis.

### **2.4.2 Internet e o mau uso de medicamentos**

A Internet é sem dúvida uma enorme revolução e um motor de pesquisa inigualável. Contudo, também pode ser perigosa, principalmente a nível de saúde. Não sabemos quem escreveu o que aparece no nosso ecrã, nem a credibilidade do que escreveu. Muitas vezes em FC, deparamo-nos com situações de uso incorreto de medicamentos, ou mesmo de produtos de saúde, que não só não ajudarão no problema, como podem até agravá-lo. Frequentemente os utentes automedicam-se porque têm ao seu dispor uma vasta informação de folhetos e imagens que podem não ajudar ao combate do problema em si. É essencial também como profissionais de saúde conseguir estabelecer contacto com o utente, de forma a ele compreender que tem nos farmacêuticos e técnicos pessoal disponível para todas as dúvidas e problemas que possam surgir, aliado a uma qualidade técnica e científica.

### 2.4.3 Superfícies comerciais que vendem Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica

A venda de Medicamentos Não Sujeitos a Receita Médica (MNSRM) é uma ameaça direta à compra de medicamentos na farmácia. Contudo não fica só por aí. Comprar medicamentos nas superfícies comerciais é comprar sem qualquer tipo de aconselhamento. E como não há aconselhamento, é comprado o medicamento errado, tantas vezes desnecessário, banalizando-se a compra destes. A maior parte das vezes estas compras não evitam que o doente recorra à farmácia ou porque o problema não foi solucionado ou, em grande parte das vezes, ocasionou efeitos secundários.<sup>10</sup> O papel do farmacêutico, nestes casos, tem que passar por uma conduta didática, promovendo o uso racional do medicamento e aconselhando o doente a optar pela farmácia, onde encontra profissionais aptos ao esclarecimento devido.

### 2.4.4 Medicamentos esgotados e falta de aceitação relativamente a alternativas

Desde que iniciei o estágio, deparei-me com vários medicamentos esgotados, alguns por dias, outros chegaram mesmo a estar esgotados durante a maior parte do estágio e por vezes não apenas no armazém mas mesmo no laboratório, tornando-se, não raras vezes, difícil poder prever a sua disponibilidade. Acaba por ser uma situação complicada ter que avisar o utente que o medicamento não se encontra disponível, principalmente quando grande parte das vezes se trata de medicação crónica ou medicação em doentes polimedicados. Aliado a isto, está a falta de aceitação de alternativas a esses medicamentos. Há medicamentos que podem ter alternativas, mas isso pode implicar a separação dos PA, obrigando à toma de mais comprimidos. Muitas vezes são doentes polimedicados os menos recetivos a trocas, colocando o farmacêutico numa posição delicada, não podendo contrariar as escolhas dos doentes.

### 2.4.5 Receitas manuais

Apesar de atualmente a maior parte das receitas serem eletrónicas, há ainda a circulação de receitas manuais, embora estas só serem permitidas em situações excecionais (falência informática, inadaptação do médico prescriptor, prescrição ao domicílio e até 40 receitas/mês).<sup>10</sup>

As receitas manuais acarretam uma maior atenção na sua dispensa pois é necessário ver a validade destas. Esta validade é verificada pela data de prescrição, nome e número do utente, vinhetas do local e do médico prescritor, a especialidade médica, a exceção que justifique o uso de receita manual, assinatura do médico e além disso é necessário um cuidado especial para a existência de número de beneficiário e regime especial de participação. Devido a todas estas variantes é muito mais provável a ocorrência de erros, não só de validação da receita mas também de interpretação. Ao longo do meu estágio dispensei muitas receitas manuais. Reconheço que algumas vezes tive dificuldade em interpretar a letra escrita e o regime especial de participação. Apesar da dificuldade, contei sempre com o apoio dos meus colegas e muito frequentemente confirmava com estes as minhas dúvidas.

### **3. Considerações Finais**

A área de farmácia comunitária pressupõe um grande contacto com o utente e com as suas necessidades e portanto, para além da capacidade técnica, requer que o farmacêutico seja também um bom ouvinte. Muitas vezes, a paciência do profissional ao saber ouvir o que o utente tem para dizer, quantas vezes assuntos alheios à receita ou prescrição de medicamentos, pode acalmar o utente que vê no farmacêutico um confidente em quem possa confiar e resolver situações e proporcionar aconselhamentos que à partida se supunham de difícil resolução. Este estágio foi de uma utilidade imprescindível, tendo contribuído para a minha formação como profissional de saúde, mas também como pessoa. O estágio serve para a melhor compreensão do papel do farmacêutico numa certa área. Neste caso, em comunitária, foi-me possível presenciar o papel fulcral do farmacêutico, a confiança em que nos é depositada e a competência e excelência com que temos que retribuir. Além de todo o conhecimento técnico que é adquirido e consolidado, há uma vertente de comunicação e trabalho de equipa que é facilmente adquirida. A comunicação e entreaajuda em farmácia comunitária é essencial, pois todos os dias há novos desafios que requerem especial atenção e ponderação.

Concluindo, posso dizer que este estágio em FC foi extremamente enriquecedor a vários níveis, contribuindo para uma realização pessoal e profissional indiscutíveis, bem como para a formação técnico/prática/científica da minha pessoa como farmacêutica, profissão que me propus abraçar há alguns anos e que continua a ser a minha realização.

ANEXOS

Anexo I



Figura 1- Formação da Gideon Ritche sobre “Farmácia e o Aconselhamento à Mulher em Atendimento”



Figura 2 - Formação da ISDIN sobre “Fotoproteção e Ureadin”

Anexo II



Figura 3 - Presença numa Ação de Sensibilização no Âmbito da Semana da Saúde na Escola Secundária Viriato em Viseu



Figura 4 - Presença da Farmácia Viriato na Feira Tons de Primavera

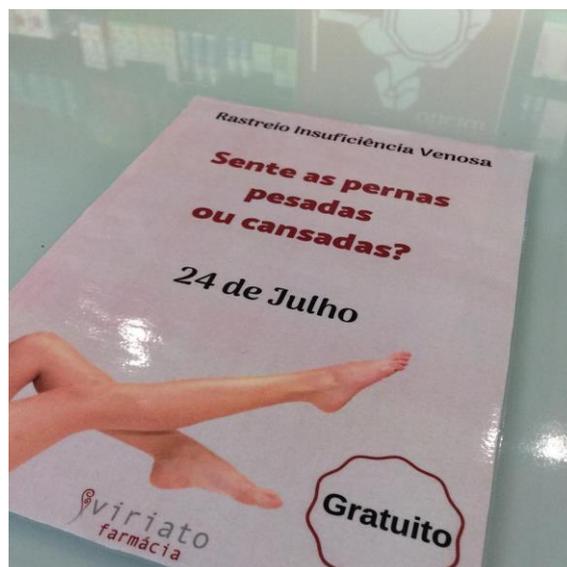


Figura 5 - Fotografia usada para promover o Rastreio nas Redes Sociais



Figura 6 - Cartaz usado para indicar a presença da Farmácia Viriato na Feira de São Mateus

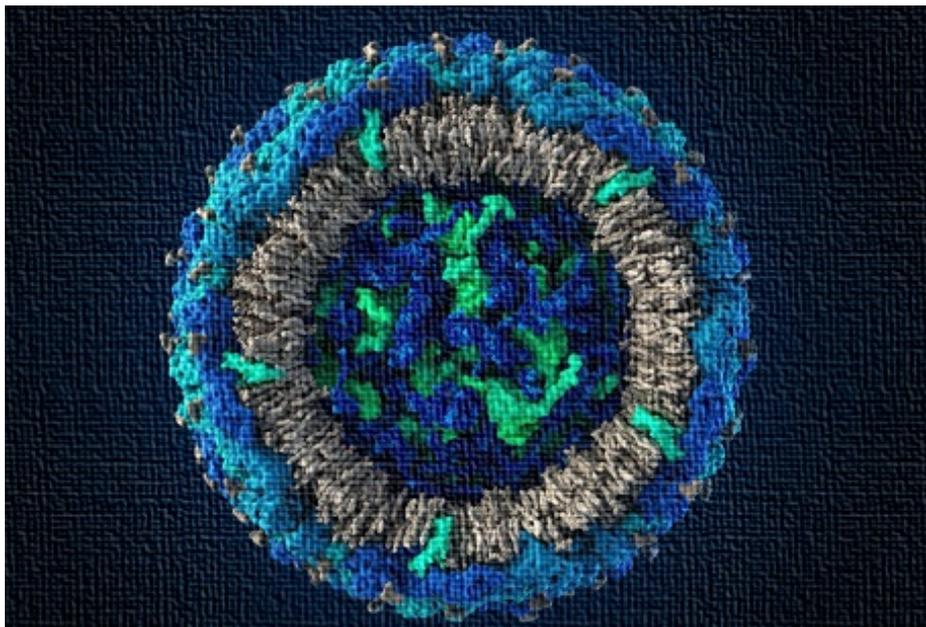
## Referências Bibliográficas

1. **CÓDIGO DEONTOLÓGICO DA ORDEM DOS FARMACÊUTICOS** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo\\_deontologico\\_da\\_of\\_4436676175988472c14020.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/codigo_deontologico_da_of_4436676175988472c14020.pdf)
2. **A Farmácia Comunitária - Farmácia Comunitária - Áreas Profissionais - Ordem dos Farmacêuticos** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: <https://www.ordemfarmaceuticos.pt/pt/areas-profissionais/farmacia-comunitaria/a-farmacia-comunitaria/>
3. **Farmacêuticos - INFARMED, I.P.** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/licenciamentos/farmaceuticos>
4. **BOAS PRÁTICAS DE FARMÁCIA COMUNITÁRIA** - [Consultado 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: [https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma\\_geral\\_sobre\\_o\\_farmaceutico\\_e\\_o\\_pessoal\\_de\\_apoio\\_5695580485ab147f4836e5.pdf](https://www.ordemfarmaceuticos.pt/fotos/documentos/norma_geral_sobre_o_farmaceutico_e_o_pessoal_de_apoio_5695580485ab147f4836e5.pdf)
5. **Farmácia Viriato - Viseu** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: <http://www.viriatofarmacia.pt/>
6. **Medicamentos manipulados - INFARMED, I.P.** - [Consultado. 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/web/infarmed/entidades/inspecao/inspecao-medicamentos/medicamentos-manipulados>
7. **Portaria n.º 594/2004, de 2 de Junho - Aprova as boas práticas a observar na preparação de medicamentos manipulados em farmácia de oficina e hospitalar** - [Consultado. 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: [http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria\\_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/portaria_594-2004.pdf/d8b8cac3-3250-4d05-b44b-51c5f43b601a)
8. **Medicamentos manipulados-Definições** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: <http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/manipulados.pdf/e97d7cfe-6ff5-4cba-929a-64c95364a7e1>
9. **Decreto-Lei 95/2004, 2004-04-22 - DRE** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: <https://dre.pt/pesquisa/-/search/223251/details/maximized>
10. **Decreto-Lei 134/2005, 2005-08-16 - DRE** - [Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet: [https://dre.pt/pesquisa/-/search/243692/details/maximized?print\\_preview=print-preview](https://dre.pt/pesquisa/-/search/243692/details/maximized?print_preview=print-preview)

**11. Normas Relativas à Prescrição de medicamentos e Produtos de Saúde -**  
[Consultado a 11 ago. 2018]. Disponível na Internet:  
[http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/ Normas\\_Prescriçãobcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872](http://www.infarmed.pt/documents/15786/17838/Normas_Prescri%C3%A7%C3%A3o/bcd0b378-3b00-4ee0-9104-28d0db0b7872)

## **PARTE II - MONOGRAFIA**

## **Zika: avanços e perspectivas futuras**



## Lista de Abreviaturas

Ac	Anticorpo
ADE	<i>Antibody-dependent enhancement</i>
AINEs	Anti-inflamatórios não esteróides
CDC	<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>
CHIM	<i>Controlled Human Infection Model</i> (modelos de infecção humana controlada)
CTB	Citotrofoblastos
DENV	<i>Dengue Virus</i> (vírus da dengue)
DNA	<i>Deoxyribonucleic Acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
EUA	<i>Emergency Use Authorization</i> (Autorização para Uso Emergência)
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
GAGs	Glucosaminoglicanos
HBC	<i>Hofbauer Cells</i>
HS	<i>Heparan sulfate</i>
HSP	<i>Heat shock protein</i>
IFN	Interferão
IUGR	<i>Intrauterine Growth Restrictions</i> (restrições de crescimento intrauterino)
JEV	<i>Japanese Encephalitis Virus</i> (vírus da encefalite japonesa)
LCR	Líquido Cefalorraquidiano
LNP	<i>Lipid nanoparticles</i> (nanopartículas lipídicas)
ME	Microscopia Eletrônica
NAAT	<i>Nucleic Acid Amplification Test</i> (teste de ácido nucleico)
NK	<i>Natural killer cells</i> (células Natural Killer)
NHP	<i>Non Human Primate</i> (Primatas não humanos)

PBMC	<i>Peripheral Blood Mononuclear Cell</i> (célula mononuclear de sangue periférico)
PIV	<i>Purified Inactivated Virus</i> (virus inativado purificado)
PRT	<i>Pathogen Removal Technology</i> (Tecnologia de Remoção de Patogêneos)
PS	<i>Phosphatidylserine</i> (fosfatidilserina)
RE	Retículo Endoplasmático
RNA	<i>Ribonucleic Acid</i> (Ácido Ribonucleico)
RT-PCR	<i>Reverse Transcription Polymerase Chain Reaction</i>
SI	Sistema Imune
SIT	<i>Sterile Insect Technique</i> (técnica do inseto estéril)
SGB	Síndrome Guillain-Barré
SNC	Sistema Nervoso Central
SNP	Sistema Nervoso Periférico
STB	Sincitiotrofoblastos
SZC	Síndrome Zika Congênito
TGN	<i>Trans Golgi Network</i> (rede Trans do Aparelho de Golgi)
TLR3	<i>Toll-like receptor 3</i>
Ttav	<i>Tetracycline repressible transactivator variant</i>
UTR	<i>Untranslated region</i> (região não codificante)
WHO	<i>World Health Organization</i> (Organização Mundial de Saúde)
WT	<i>Wild Type</i> (tipo selvagem)
VLP	<i>Virus-like particles</i> (partículas tipo vírus)

## RESUMO

Zika é uma doença infecciosa causada pelo vírus zika que pertence à família *Flaviviridae*. Este vírus é transmitido maioritariamente pela picada de um mosquito, sendo o mosquito *Aedes* o vetor primário. Ao contrário dos outros flavivírus, o zika tem a particularidade de poder ser transmitido por via sexual.

O vírus zika permaneceu relativamente desconhecido até 2007, quando ocorreu o primeiro surto na ilha de Yap, na Micronésia, mas na altura foi associado a uma doença suave, uma vez que a maior parte da população não apresentava sintomas. Porém, o reaparecimento da infeção por este vírus e a sua associação com anomalias neurológicas e malformações no sistema nervoso central (SNC), como microcefalia e Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e suspeitas de microcefalia congénita devido à infeção durante a gravidez, alertaram as autoridades de saúde pública. Em 2016 a *World Health Organization* (WHO) declarou zika como uma emergência de saúde pública.

Desde o recente surto do vírus zika ocorrido no Brasil, com o primeiro caso confirmado em maio de 2015, que se tem investigado incessantemente para desenvolver métodos de diagnóstico sensíveis bem como fármacos e moléculas eficazes além de medidas adequadas de prevenção e controlo para evitar a propagação de zika e os seus efeitos. O desenvolvimento de testes de diagnóstico fiáveis tem-se revelado difícil devido à reatividade cruzada do vírus com outros flavivírus e devido à baixa especificidade destes testes em pessoas anteriormente expostas a um flavivírus. Os métodos disponíveis neste momento são os métodos serológicos e os métodos moleculares, sendo os métodos moleculares baseados na deteção do RNA viral os mais utilizados para fazer diagnóstico na fase aguda. Os métodos serológicos apenas devem ser realizados após a seroconversão.

As principais medidas de prevenção da infeção por zika incluem o controlo de vetores, terapêuticas e vacinação. O controlo de vetores engloba várias medidas físicas de proteção individual da picada do mosquito e também medidas químicas e biológicas com o objetivo de reduzir a população de vetores.

Face à falta de medicamentos aprovados para a prevenção da infeção, encontra-se em investigação a possibilidade de reutilização de certos compostos já existentes para serem usados como antivirais e o uso de Anticorpos (Ac) monoclonais como potencial terapêutica para flavivírus. Estes Ac são muito específicos e apresentam menos imunogenicidade e toxicidade fora do alvo que as moléculas antivirais.

Como não é possível uma quimioprofilaxia constante e devido à agressividade e propagação do vírus, é urgente uma vacina segura e eficaz. Devido ao conhecimento da estrutura do vírus e conhecimento dos antígenos alvo e tendo como base o desenvolvimento de vacinas bem sucedidas para outros flavivírus, foi possível criar várias plataformas de vacinas que estão atualmente em ensaios clínicos.

O objetivo desta monografia é observar a evolução do conhecimento sobre o vírus zika, abordar os vários modos de transmissão e de infecção básica, adquirir novos conhecimentos sobre os métodos de diagnóstico, assim como perspetivar algumas medidas preventivas em estudo.

Palavras-chave: Vírus zika, mosquito *Aedes*, microcefalia, Síndrome Guillain-Barré, RT-PCR, Anticorpos, antivirais, vacina.

## ABSTRACT

Zika is an infectious disease caused by the zika virus that belongs to the *Flaviviridae* family. The zika virus is mainly transmitted by a mosquito bite, being the primary vector the mosquito *Aedes*. Unlike the other flaviviruses, zika has the particularity of being capable of sexual transmission.

The virus remained relatively unknown until 2007, when its first outbreak occurred on the Yap island, in Micronesia, but at the time it was associated with a mild disease since most of the population showed no symptoms. However the resurgence of the virus and its association with neurological abnormalities and central nervous system malformations, such as microcephaly and Guillain-Barré Syndrome and suspicions of congenital microcephaly due to infection during pregnancy, alerted the authorities of public health. In 2016, World Health Organization (WHO) declared zika as a Public Health Emergency.

Since its most recent outbreak in Brazil, with its first confirmed case in May 2015, it has been unceasingly investigated the development sensitive diagnostic methods as well as drugs and molecules effective besides suitable measures of prevention and control in order to avoid the spread of zika and its effects. The development of reliable diagnostic testing has revealed to be hard work due to cross reactivity of the virus with other flaviviruses and due to the low specificity of these test in persons previously exposed to a flavivirus. The currently available assays are serological assays and molecular assays, and the molecular assays, that detect viral RNA are the most used to make diagnosis in acute phases. The serological assays should only be used after seroconversion.

The main measures of prevention of zika infection include vector control, therapeutics and vaccination. Vector control encompasses several physical measures of individual protection of the mosquito bite and also chemical and biological measures with the goal of reducing vector population.

In view of the lack of approved medicines for the prevention of infection, it is under investigation the possibility of the reuse of certain compounds already existing to be used as antivirals and the use of monoclonal antibodies as potential therapy to flavivirus. These antibodies are highly specific and show less immunogenicity and toxicity outside the target than small antiviral molecules.

As it is not possible permanent prophylaxis and due to the aggressive nature of the virus and its spread, it is urgent a safe and effective vaccine. The knowledge of the virus structure and its target antigens, and having as base the development of successful vaccines to other flavivirus, permitted the creation of several vaccine platforms that are currently in clinical trials.

The goal for this monograph is to observe the evolution of the knowledge of the zika virus, approach the several routes of transmission and basic infection, acquire new awareness about diagnostic methods as well as prospect some prevention measures currently in study.

Keywords: Zika virus, Aedes mosquitoes, microcephaly, Guillain-Barré Syndrome, RT-PCR, antiviral drugs, vaccine.

## I. Introdução

Zika é uma doença transmitida pela picada de um mosquito infetado. O vírus zika faz parte dos arbovírus, que é uma “classificação biológica de vírus baseada na transmissão por vetores artrópodes hematófagos”, pertence à família *Flaviviridae* e esta família está dividida em quatro géneros, *Flavivirus*, *Pestivirus*, *Hepacivirus* e *Pegivirus*, sendo o vírus zika um *Flavivirus*.<sup>1, 2, 3</sup>

O vírus zika foi identificado pela primeira vez no ano de 1947 na floresta zika, no Uganda, após deteção em macacos sentinela para monitorização da febre amarela, e isolado em 1948 em mosquitos *Aedes africanus*.<sup>4</sup> Na figura 1 podemos observar a descrição dos vários surtos ocorridos desde então nas diversas regiões do mundo.

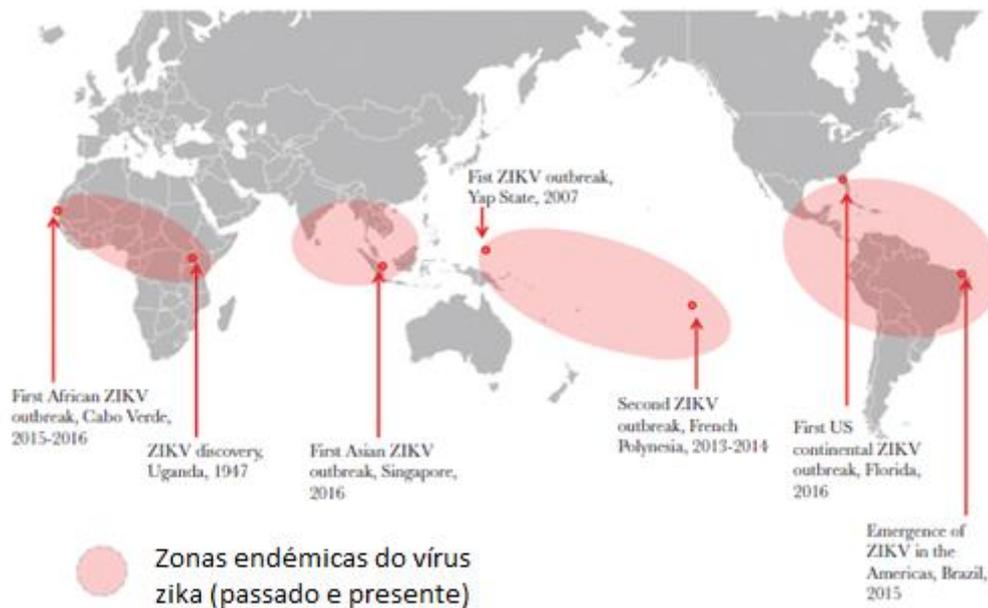


Figura 1 - Regiões geográficas onde o vírus zika é endêmico e onde causou epidemias (adaptado de GUBLER, D. J., VASILAKIS, N. and MUSSO, D. History and Emergence of Zika Virus. *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S860–S867 <sup>5</sup>)

A análise filogenética de Zika identificou duas linhagens, a africana e a asiática, sendo a asiática responsável neste momento pela epidemia; no entanto, é assumido que as duas linhagens provocam a mesma doença.<sup>7</sup> Apesar da semelhança entre as duas linhagens, há diferenças subtis, nomeadamente na glicosilação da proteína E, que apenas ocorre na linhagem asiática, que podem ter impacto na virulência e tropismo viral.<sup>6</sup>

A recente diminuição do número de casos de zika poderá estar associada, por um lado ao elevado número de pessoas infetadas e que adquiriram naturalmente imunidade à doença, e por outro ao controlo bem sucedido de vetores.<sup>7</sup> É provável que o vírus se continue a

espalhar; contudo, é difícil de prever se a transmissão continuará endêmica ou se passará a ser episódica, com períodos de inatividade e padrões sazonais de transmissão, como acontece com arbovírus.<sup>6,8</sup>

Devido às manifestações pouco específicas, baixa disponibilidade de testes e erros de diagnóstico motivados pela reatividade cruzada, acaba por ser difícil caracterizar a epidemiologia da doença.<sup>9</sup> Segundo dados recentes, cerca de 84 países foram já afetados com o vírus.<sup>6</sup>

## 2. Estrutura do Vírus

Através de microscopia crioeletrônica foi possível estudar a estrutura de ZIKV. ZIKV tem uma patobiologia única e, apesar de ter uma estrutura similar a outros flavivírus, é suficientemente diferente para não se ter a certeza da especificidade dos seus recetores, transmissão e antigenicidade.<sup>10</sup>

O vírus zika é um vírus de RNA de cadeia simples de polaridade positiva ((+)ssRNA), não segmentado e envelopado. O seu genoma de 11kb, é constituído por duas regiões não codificantes (5' e 3'). Entre estas duas regiões têm uma *Open Reading Frame*, que é traduzida numa poliproteína com cerca de 3419 aminoácidos de comprimento. Esta poliproteína codifica dez proteínas individuais. A clivagem da poliproteína nas dez proteínas individuais é realizada por proteases do vírus e do hospedeiro. As proteínas estão divididas em dois grupos, as estruturais e as não estruturais. As estruturais são três, a proteína do envelope (E), a proteína da cápside (C) e a proteína da membrana (M) ou precursora da membrana (prM), estando todas elas ancoradas na membrana lipídica. As proteínas não estruturais desempenham funções na virulência, replicação, secreção, patogenicidade e antagonizam a resposta imunológica do hospedeiro. Estas proteínas não estruturais são sete, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5.<sup>6, 10</sup> A estrutura do vírus está ilustrada na figura 2.

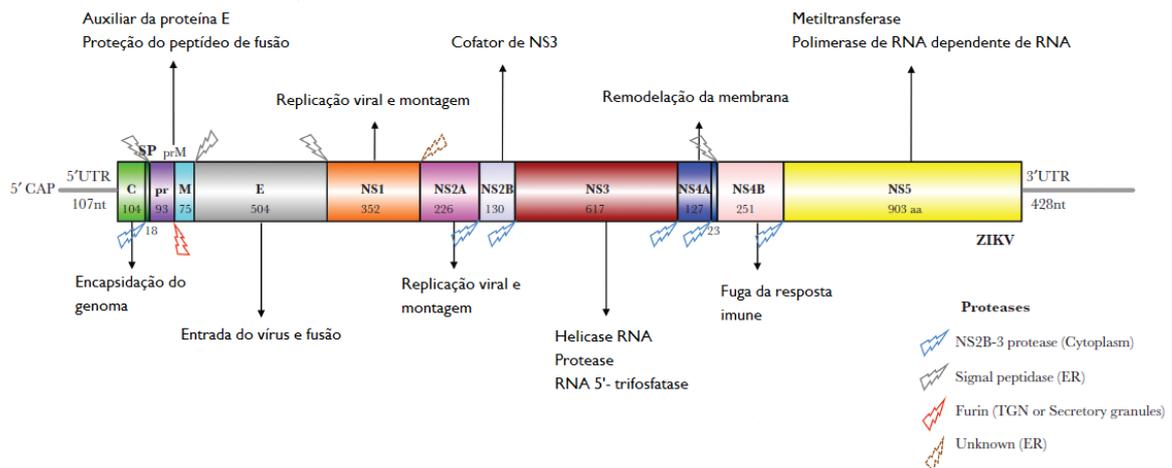


Figura 2- Estrutura do RNA genômico do vírus zika, localização, função e local de clivagem das proteínas (adaptado de SIROHI, D. and KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S935–S944 <sup>10</sup>)

O vírus maduro é um vírus pequeno, com cerca de 50nm. <sup>10</sup> O viriônio maduro tem uma estrutura com simetria icosaédrica, constituída por cerca de 180 cópias da proteína E e por proteínas M integradas no envelope viral. <sup>11</sup>

Os flaviviriões não são estáticos nem fechados. As suas glicoproteínas estão em constante movimento, chamado de “breathing”. Devido a este dinamismo, acabam por se formar diferentes conformações e diferentes panorâmicas antigénicas. <sup>10</sup>

### 3. Infeção por vírus Zika

O mosquito infetado ao picar o indivíduo liberta saliva que contém o vírus. Este vírus vai penetrar pela epiderme e derme e entrar nas células da pele através de recetores celulares. Os queratinócitos (presentes na epiderme) e os fibroblastos e células dendríticas imaturas (presentes na derme) são células suscetíveis, permitindo a entrada do vírus. <sup>12</sup> Para o vírus estabelecer infeção tem que ter acesso à célula hospedeira e esta célula tem que conter não só recetores como também fatores apropriados para a ligação. <sup>10</sup>

A entrada do vírus nas células hospedeiras depende do contacto adequado das proteínas E com o recetor na célula alvo. Estas glicoproteínas são um determinante importante pois não só servem como ligando e fator de entrada, como também induzem a fusão entre as membranas da célula do hospedeiro e o envelope viral. Estudos mostram que a proteína E

não se liga diretamente aos recetores celulares no primeiro contacto mas sim com fatores de ligação como glucosaminoglicanos (GAGs) presentes na superfície das células.<sup>10, 11</sup> Esta ligação aumenta a densidade das partículas virais e leva a interações de elevada afinidade entre as proteínas E e os recetores alvo. Assim, glicosaminoglicanos como o *heparan sulfate* (HS) servem como fator de ligação. Um dos fatores promissores é o CD209 ou DC-SIGN, que é uma molécula dendrítica de adesão celular. É uma lectina de tipo C, que é expressa em macrófagos e células dendríticas, que são alvos primários durante a infeção. Um homólogo de DC-SIGN encontrado nas células endoteliais do fígado e nódulos linfáticos, chamado de DC-SIGNR, também pode ser usado pelos flavivirus para entrarem nas células.<sup>10</sup>

Os flavivirus podem mudar drasticamente o seu conteúdo de carboidratos da superfície, seja devido à presença ou ausência de glicosilação na superfície das proteínas ou pelo estado de maturação da partícula viral, isto porque o peptídeo pr é glicosilado. Por isso a diversidade de glicanos na superfície do virião traduz-se no uso de diferentes recetores de lectinas por diferentes flavivirus.<sup>10</sup>

Os recetores TIM e TAM são as moléculas de entrada melhor caracterizadas para o vírus zika. Estes recetores pertencem a duas famílias distintas que se ligam a resíduos de fosfatidilserina (PS) presentes na membrana do virião, e estão envolvidas na deteção de sinais apoptóticos nas membranas das células apoptóticas, o que desencadeia a fagocitose destas células moribundas pelo sistema imune. Acredita-se que o flavivirus usa esta deteção apoptótica para invadir as células alvo. Estes recetores são únicos pois ligam aos fosfolípidos na superfície do virião em vez de ligar às glicoproteínas da superfície. Os membros da família TIM (TIM-1, TIM-3 e TIM-4) ligam aos lípidos diretamente enquanto que os membros da família TAM ligam indiretamente aos lípidos, através de ligandos como o Gas6 e a proteína S.

A ligação dos flavivirus a estes recetores foi uma surpresa, porque os estudos indicam que o que cobre a superfície do virião são glicoproteínas e assim os lípidos não estariam tão facilmente acessíveis para se poder dar a ligação. Mas, devido ao dinamismo dos viriões, os lípidos conseguem ser expostos à superfície de modo a que a ligação se dê.<sup>10</sup>

Várias proteínas parecem ser recetores promissores na entrada do vírus, como a integrina  $\alpha\beta3$ , a HSP70 (*heat shock protein*), HSP90, claudin-1 (*tigh junction protein*), e por isso, são consideradas assistentes. Até mesmo Ac não neutralizantes podem ser usados como recetores substitutos para a entrada viral em células com o recetor Fc.<sup>10</sup> A proteína Musashi-1 é promissora, pois é muito expressa nas células neuronais progenitoras, retina e

testículos, sendo também necessária para o desenvolvimento neuronal e a sua depleção ou mutação está associada a microcefalia. A ligação desta proteína à região 3' não traduzida do genoma, pode impedir a célula de realizar as suas funções e levar a um déficit no desenvolvimento neuronal.<sup>10</sup>

Foram realizados estudos em cérebros de murganhos bebés, nascidos de mães infetadas, tendo sido observado que os genes responsáveis pela autofagia e apoptose, como Bmf, Irgm1, Bcl2, Htt, Casp6 e Abl estavam sobre-regulados. Além disso, também se detetou a regulação positiva do gene de recetores toll-like 3 (TLR3). Este gene está indiretamente ligado à apoptose, devido ao seu efeito inibitório das vias de transdução de sinal encontradas nas células neuronais progenitoras. Isto explica o envolvimento de zika na regulação da neurogénese e de genes apoptóticos.<sup>13</sup>

### **3.1 Infecção materna**

O vírus zika pode replicar em trofoblastos, células fetais endoteliais e células de Hofbauer placentárias (HBCs). Deste modo, a infecção pode estabelecer-se na placenta, causando lesões vasculares graves e uma redução do fluxo sanguíneo e dos vasos sanguíneos fetais. A infecção e morte das células progenitoras neuronais podem inibir a diferenciação das células neuronais, o que pode explicar a redução e malformação das estruturas cerebrais e microcefalia.<sup>14</sup>

Os recetores Tyro3, Axl e Mer (membros da família TAM das tirosinas cinases) e os TIM-1 que regulam funções imunes inatas e adaptativas para a sobrevivência da célula, desempenham um papel na promoção da entrada do vírus nas células placentárias. Axl é um recetor expresso em vários tipos de células presentes na interface materno-fetal, suscetíveis à infecção por ZIKV. Além do mais, os recetores TAM depois de ativados podem diminuir a resposta imunitária inata e inibir as interferências tipo I, o que pode bloquear os seus efeitos antivirais.<sup>15</sup>

Se o vírus zika replicar em qualquer componente da unidade feto-placentar, a replicação ativa manterá e prolongará a virémia materna e isso pode ser a explicação para a positividade prolongada em RT-PCR na gravidez. O vírus pode estabelecer infecção tanto no cérebro fetal como na placenta e, em teoria, movimentar-se de qualquer um destes para o sangue materno.<sup>14</sup> As vilosidades fetais estão cobertas por uma camada de células

trofoblásticas, sincitiotrofoblastos e citotrofoblastos (STBs e CTBs). As vilosidades são muito vascularizadas por capilares fetais, e dentro dessas vilosidades estão as células de Hofbauer, que são macrófagos muitos vacuolizados. Para que possa ocorrer transmissão do vírus, do sangue materno para o feto, o vírus tem que atravessar as várias camadas de células ou então ser transportado. Dada a localização das células de Hofbauer dentro das vilosidades, estas células podem servir de reservatório do vírus e disseminá-lo para o sangue do feto, pois já foi detectado RNA viral na placa coriônica em gravidezes.<sup>15</sup>

### 3.2 Modelos Animais da Infecção

Os modelos animais têm um papel extremamente importante na compreensão da infecção, transmissão e patogênese viral, identificação de vacinas candidatas e teste de terapêuticas. O objetivo é desenvolver modelos animais que consigam reproduzir vários aspectos da infecção humana e a sua doença.<sup>6</sup> Um modelo ideal é aquele que equilibra o aspecto científico com as suas limitações e os custos. É a informação combinada de vários modelos que vai permitir ter o melhor conhecimento da biologia viral.<sup>16</sup> É essencial ter um modelo disponível que consiga simular a condição clínica humana durante a infecção.<sup>13</sup>

Para estudar a infecção sistêmica é muito comum usarem-se modelos de murganhos imunocomprometidos, que não expressam a resposta de interferões (IFN).<sup>6</sup> Estes modelos têm sido os mais utilizados no estudo da patogênese do vírus zika. Apesar de haver alguns problemas relativamente à homologia entre os murganhos e humanos na sua patogênese, estes apresentam bastantes similaridades na genética e desenvolvimento. Os modelos que se têm usado são de murganhos A129 e AG129. Os primeiros não expressam os recetores de IFN tipo I, enquanto que AG129 não expressa nem os recetores tipo I nem tipo II. Quando murganhos com idade até 3 semanas são infetados, em ambos os modelos há morte. Em murganhos de idade adulta infetados com o vírus, em ambos os modelos há presença de virémia, perda de peso e doença.<sup>13</sup>

Apesar de os murganhos representarem um modelo de zika fácil de estudar, há diferenças entre murganhos e humanos que fazem com que sejam necessários outros modelos. Várias espécies de primatas não humanos (NHP) são extremamente semelhantes em muitos aspectos aos humanos, nomeadamente na sua suscetibilidade para infecção, replicação viral, respostas imunológicas e mesmo patogênese da infecção.<sup>16</sup>

#### 4. Replicação

A replicação de ZIKV começa após a ligação da proteína E aos recetores na membrana do hospedeiro e a entrada na célula por endocitose, mediada por proteínas formando uma vesícula endocítica.<sup>13</sup> O baixo pH do endossoma vai levar a alterações conformacionais, possibilitando a fusão entre o envelope viral e a membrana do endossoma, o que vai libertar a cápside viral para o citoplasma onde ocorre a tradução de proteínas, replicação do genoma e a montagem das partículas virais.<sup>11</sup>

O genoma é sintetizado em vesículas de replicação induzidas pelo vírus que são derivadas do retículo endoplasmático (RE).<sup>10</sup> O ZIKV vai replicar nas *Replication Factories* (RF) membranosas induzidas pelo vírus. O RE de células hepáticas e neuronais progenitoras humanas infetadas com o vírus, mostraram invaginações com aberturas, semelhantes a poros, para o citosol. Usando microscopia eletrónica (ME), viu-se que a infeção por ZIKV causa mudanças drásticas nos microtúbulos e filamentos de organização, formando estruturas tipo jaula.<sup>18</sup>

As partículas virais imaturas medem aproximadamente 60 nm e não são infecciosas. Estas são glicosiladas no RE, seguido de um transporte pela rede trans do aparelho de golgi (TGN), onde os seus glicanos de superfície são cortados. A partícula encontra um ambiente ligeiramente ácido, que vai ser suficiente para desencadear o rearranjo das prM/E, onde se vão formar os homodímeros de proteína E. Este rearranjo vai expor o local de clivagem à proteína furina do hospedeiro para que esta possa atuar na junção prM e dar-se a clivagem para a formação da partícula madura.<sup>10</sup> (Figura 3)

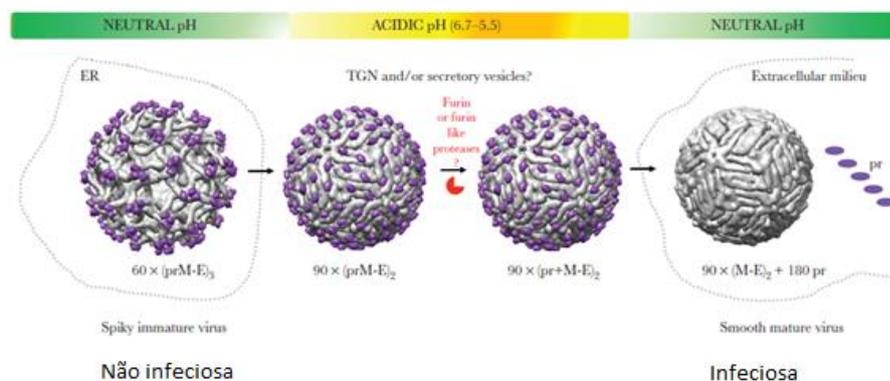


Figura 3- Maturação dos flavivírus (adaptado de SIROHI, D. and KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S935–S944<sup>10</sup>)

## 5. Resposta imunológica ao vírus

### 5.1 Imunidade inata e imunidade mediada por células

A resposta imunológica humana à infecção provocada pelo vírus zika não está ainda totalmente caracterizada, contudo a caracterização dessa resposta já foi possível nos modelos primatas não humanos. Observou-se que nestes modelos, após a infecção, há um aumento da ativação de células dendríticas e uma ativação precoce e de elevado nível das células NK (resposta imune inata). Também se verificou que as células T são estimuladas durante a infecção primária por zika, tendo-se concluído que as células T CD4+ e T CD8+ foram muito ativadas, facto comprovado pelo marcador precoce da ativação de células CD69.<sup>16</sup>

### 5.2 Imunidade humoral e de outros flavivírus

Pensa-se que os Ac neutralizantes sejam o maior fator de proteção contra a infecção pelo vírus zika. Aliás, Ac neutralizantes humanos direcionados para a proteína E já mostraram ser protetores contra a infecção por zika em ensaios com murganhos AG129.<sup>6</sup> Foram analisados os Ac que ligam à proteína E e verificou-se que o seu Fab liga ao *fusion loop* muito conservado. Esta ligação vai impedir que a proteína E interaja com a membrana da célula alvo e entre na célula. Um exemplo é um Ac monoclonal humano (C10), isolado de um doente infetado com DENV (vírus dengue), que tem uma atividade neutralizadora potente contra o ZIKV. Este mostrou ser capaz de ligar às 180 proteínas E, associando o seu Fab às extremidades do dímero da proteína E, criando um bloqueio intradímeros. Logo, este Ac neutraliza a infecciosidade do vírus por estabelecer uma ligação cruzada com as proteínas E, impedindo a entrada do vírus para a célula. Outro exemplo é o Ac ZIKV-117, também isolado de um doente infetado, que mostrou ser muito neutralizante sem reatividade cruzada.<sup>10</sup> Foi também observado em murganhos, que a transferência passiva de Ac contra zika gerava proteção.<sup>6</sup>

Apesar de os Ac poderem conferir proteção contra a infecção por zika, há sempre a possibilidade de *antibody-dependent enhancement* (ADE), que pode ocorrer devido à reatividade cruzada e a Ac não neutralizantes. ADE é um fenómeno imunológico em que Ac não neutralizantes facilitam a entrada do vírus em células com recetores FcγR, como monócitos ou macrófagos. Ou seja, a imunidade pré-existente a um flavivírus não só não

protege, como os complexos vírus-anticorpo são endocitados e amplificam a disseminação viral. A maior preocupação é se a imunidade de DENV ou ZIKV, seja ela natural ou induzida, cause ADE. Também levanta questões relativamente à segurança no desenvolvimento de vacinas e terapias com Ac, pois os locais mais afetados por zika são endêmicos para outros flavivírus.<sup>11, 16, 19</sup>

Não há indicações epidemiológicas que digam que infecções prévias por DENV resultem em ADE na infecção por zika pois, apesar de ADE ocorrer *in vitro*, um estudo usando o modelo animal de primatas não humanos não causou ADE. Num outro estudo realizado em humanos não houve inclusive aumento de RNA viral nem aumento da resposta das citocinas.<sup>16</sup> Há também informação recente que indica que Ac produzidos contra a dengue, não só protegem para o vírus zika como também protegem o feto de lesões neurológicas.<sup>7</sup>

Uma maneira de minimizar ADE é desenhando ou investigando Ac que reconhecem mais epitopos e com ações neutralizadoras mais potentes. L234A e L235A são mutações duplas (LALA) no domínio Fc da IgG, e estas têm mostrado anular a ligação de IgG a FcγR. Assim Ac com esta variante contra ZIKV mostraram ter poder neutralizante mas sem causar ADE. Contudo, apesar de eliminarem o risco de ADE, perdem a sua capacidade efetora.<sup>11</sup>

O aumento precoce da concentração de Ac de zika detetado no soro (2-3 dias após início da febre) é causado pela indução de plasmoblastos que produzem Ac e que aparecem no sangue periférico transitoriamente após exposição ao antígeno. As células B podem secretar IgM, IgA, IgG, que acabam por ficar indetetáveis após 20 dias do início dos sintomas. Plasmoblastos de dadores já expostos a dengue mostram elevados níveis de hipermutação somática, que é um mecanismo de mutação das células que as torna mais capazes de detetar elementos invasores. A maioria das respostas de células B na fase aguda foi devido às células B de memória. Em dadores *naïves* a dengue, não se verificou hipermutação mas sim uma resposta à infecção clássica, não apresentando grande expansão clonal.<sup>20</sup>

Os Ac de fase pós convalescença neutralizam mais potentemente que os Ac de fase aguda e além disso ligam melhor aos antígenos de zika e com maior afinidade que os Ac das células B de memória e que os Ac derivados de plasmoblastos. A seroconversão de IgM costuma aparecer por volta de uma semana após a infecção, mas pode ocorrer mais cedo. IgM vai manter-se detetável durante cerca de 2 meses. Já as IgG neutralizantes desenvolvem-se pouco depois de IgM e podem persistir por anos ou décadas.<sup>20</sup>

## 6. Manifestações clínicas da doença

As manifestações clínicas da doença são semelhantes às de outras infeções por arbovírus, e incluem febre, erupções cutâneas, conjuntivite, dores nos músculos e nas articulações, mal-estar ou dor de cabeça. Os sintomas surgem 2-3 dias após a infeção e em cerca de 80% dos casos a infeção é assintomática, o que torna difícil a deteção mesmo com vigilância. A duração total da doença costuma ser de 5-7 dias, havendo casos de resolução ao fim de 2 dias. Indivíduos com imunidade comprometida são mais suscetíveis de desenvolver doenças graves se forem infetados com o vírus.<sup>12</sup>

O tratamento para estes sintomas consiste em descanso, fluidos, analgésicos, antipiréticos e anti-histamínicos para as erupções cutâneas. É aconselhado que nas primeiras duas semanas se evitem novas picadas de mosquito de forma a evitar a transmissão secundária. No tratamento de sintomas não se devem utilizar a aspirina e os AINEs, até se ter excluído o diagnóstico de dengue, devido ao risco de hemorragia que existe nestas doenças.<sup>12, 21</sup> A co-infeção de DENV/ZIKV até agora não demonstrou ter efeitos sinérgicos nem na severidade nem na apresentação clínica de nenhuma das doenças. A morte por zika é rara e nos casos reportados não se sabe ao certo a contribuição da infeção para a mortalidade.<sup>21</sup>

### 6.1 Complicações associadas à infeção por zika

A principal complicação que predomina no espectro de doenças neurológicas nos adultos provocadas por infeção por ZIKV é a Síndrome Guillain-Barré (SGB). SGB é uma doença autoimune neurológica do sistema nervoso periférico (SNP) que se manifesta maioritariamente nos axónios motores e resulta numa desmielinização inflamatória, normalmente desencadeada por um agente infeccioso. Manifesta-se por uma paralisia ascendente com sintomas sensoriais, fraqueza progressiva e simétrica dos membros e hiporreflexia/arreflexia, tendo como sintoma sensorial mais comum a parestesia. Há contudo quem demonstre défices nos nervos craniais ou paralisia facial.<sup>19</sup> SGB é mais comum em homens que mulheres e costuma afetar pessoas entre 30-50 anos de idade.<sup>6</sup>

Não se sabe ainda muito bem o mecanismo para ZIKV-SGB, suspeitando-se que existam mudanças genéticas virais adaptativas e interações imunológicas com outros flavivírus ou com fatores do hospedeiro. Contudo, as mudanças genéticas do genoma viral ou a

substituição de aminoácidos nas proteínas não podem explicar a mudança da neurovirulência dos genótipos asiáticos, desde a doença suave, que se deu na Micronésia, para o surgimento de complicações neurológicas. Assim a hipótese mais plausível é a da alteração imunomediada, possível com o perfil de parainfeção, em que o sistema imune ataca os nervos e danifica a mielina.<sup>19</sup>

Outras complicações incluem encefalite, meningoencefalite, mielite aguda, encefalopatia e convulsões.<sup>6</sup> Uma hipótese para o papel do vírus nas malformações no SNC é explicada pelo facto de o vírus, durante a replicação viral, assumir o processo de autofagia. Algumas proteínas têm papel duplo na autofagia e na estabilidade de centrossomas. Um número normal de centrossomas é importante para o desenvolvimento do cérebro e há estudos que revelam que um elevado número destes resulta em microcefalia. Assim, o facto de o vírus interferir na autofagia levanta a hipótese que ele é responsável pelo aumento de centrossomas e por conseguinte levar a microcefalia.<sup>12</sup>

## **6.2 Síndrome de zika congénito**

A infeção na gravidez pode dar origem a uma síndrome de zika congénito (SZC). Esta infeção na grávida origina os mesmos sintomas que nas pessoas não grávidas. O termo SZC é usado para designar um conjunto de manifestações clínicas e imagiológicas do SNC e alterações oculares e ortopédicas encontradas em crianças com infeção congénita.<sup>14</sup>

Como já foi abordado, ZIKV pode atravessar a placenta e atingir o cérebro do feto, onde infeta preferencialmente as células neuronais progenitoras, podendo levar à inibição da diferenciação destas células o que explicaria a redução do córtex, malformação das estruturas cerebrais e microcefalia, observados durante a gravidez. O SZC é caracterizado por vários traços distintos que se focam no desenvolvimento de anomalias no cérebro, incluindo microcefalia e calcificações, manifestações na retina e defeitos nas extremidades, tais como contraturas congénitas e hipertonia.<sup>14</sup>

Processos inflamatórios na placenta podem levar à alteração da expressão e regulação de neuropeptídeos e fatores de crescimento e, se estes tiverem um papel importante no desenvolvimento do cérebro, pode resultar em microcefalia.<sup>13</sup> A microcefalia é uma consequência de várias anomalias causadas pelo vírus e apresenta características fenotípicas como redundância do escalpe, conforme se observa na figura 4, talípe (pé torto),

artrogripose, oftalmoscopia alterada e alterações neurológicas como hipertonia, espasticidade e hiperreflexia.<sup>22</sup>

Esta síndrome de zika congênito pode ser apenas o início, pois ainda não se sabe o alcance da doença e as disfunções que podem mais tarde aparecer. Com o tempo serão descritas dificuldades no desenvolvimento, aprendizagem e outras consequências desconhecidas provenientes da infecção intrauterina por zika.<sup>14</sup>

Além de SZC, as mulheres grávidas infetadas podem ter abortos espontâneos ou dar à luz nados mortos. Mesmo quando não existam anomalias associadas ao cérebro do feto, pode haver problemas no crescimento e disfunções na placenta. Estas deficiências funcionais tendem a evoluir de diferentes formas dependendo da reabilitação e estimulação. As anomalias neurológicas podem também estar presentes em recém-nascidos com perímetro cefálico normal.<sup>14, 22</sup> Em geral, os resultados da ecografia costumam dar o diagnóstico de microcefalia fetal.<sup>23</sup>



Figura 4- Imagens de bebês com SZC; a e c apresentam microcefalia severa mostrando c redundância da pele do escalpe; b apresenta microcefalia com osso occipital proeminente (adaptado de DA SILVA PONE, M. V., MOURA PONE, S., ARAUJO ZIN, A., BARROS MENDES, P. H., SENRA AIBE, M., BARROSO DE AGUIAR, E. and DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA, T. Zika virus infection in children: epidemiology and clinical manifestations. *Child's Nerv. Syst.* **34**, (2018) 63–71<sup>22</sup>)

### 6.3 Manifestações em crianças expostas ao vírus

O desenvolvimento de microcefalia pós-natal foi descrito em bebês nascidos com cabeças normais mas que mais tarde revelaram um atraso no crescimento. Isto sugere que a infecção se pode manifestar depois do nascimento, devido ao tempo que as células necessitam para expressar as alterações.<sup>14</sup>

As crianças que adquirem a doença depois do nascimento têm sintomas similares aos dos adultos. Crianças e adolescentes com idade média de 14 anos, apresentaram febre e exantema como os sintomas mais comuns, sem qualquer tipo de complicação neurológica ou morte associadas.<sup>22</sup>

## 7. TRANSMISSÃO

A maioria das infecções por vírus zika é transmitida pelo vetor; contudo, com o passar dos anos, têm sido identificadas outras vias de transmissão alternativas.

### 7.1 Transmissão por vetor

A maioria das infecções é transmitida pelo mosquito, sendo o vetor primário da espécie *Aedes*. *Aedes aegypti* está relacionado com quase todos os surtos urbanos, apesar de *Ae. hensilli* e *Ae. polynesiensis* serem vetores conhecidos da Micronésia e Polinésia Francesa respectivamente. Pensa-se portanto que *Ae. aegypti* seja a espécie mais competente. A competência destes mosquitos varia com a origem geográfica, estirpe e modo de infecção. A aquisição do vírus através do mosquito ocorre depois de uma refeição de sangue pois o mosquito fêmea necessita de sangue para os ovos e, ao alimentar-se, injeta saliva infetada. Estudos recentes revelaram que existe uma preocupação com o potencial vetor *Ae. albopictus*, uma vez que este tende a expandir-se para climas mais temperados, podendo originar novos surtos; no entanto, como não vivem em proximidade com os humanos, não têm tanta preferência por se alimentar destes.<sup>15</sup>

### 7.2 Transmissão sexual

Uma das diferenças principais do vírus zika em relação a outros flavivírus, é a sua capacidade de ser transmitido sexualmente, não se sabendo ao certo qual a dose infecciosa necessária para a transmissão se dar. Ainda não são conhecidos quais os componentes do sêmen que contêm o vírus infeccioso, pois o RNA viral foi encontrado em sêmen de homens sem espermatozóitos, mas os antígenos para o vírus têm sido visualizados na cabeça de espermatozóitos.<sup>15</sup>

Têm sido desenvolvidos estudos no sentido de determinar a frequência e duração da libertação de ZIKV nos fluidos genitais, especialmente sêmen. Os homens devem esperar pelo menos 6 meses após a exposição ao vírus para ter relações sexuais desprotegidas e nas mulheres, é recomendado pelo menos 8 semanas. De realçar que a transmissão sexual pode ser feita por contacto oral, vaginal ou anal.<sup>15</sup> Não se sabe ao certo se o risco de transmissão sexual de homens infetados se compara com o risco de ser infetado pela picada do mosquito ou se a infeção por via sexual confere risco adicional para a lesão fetal, comparado com a infeção por vetor.<sup>15</sup>

### **7.3 Transmissão vertical**

Uma vez que o vírus ZIKV foi detetado em secreções vaginais, é possível que ocorra a transmissão vertical, tanto por contacto com a mucosa vaginal, com a placenta, com sangue ou com as secreções vaginais durante o parto. O RNA viral foi detetado no fluido amniótico e em tecidos de fetos infetados durante a gravidez.<sup>14</sup> Como já vimos, o vírus infeta numerosos tipos de células primárias da placenta, o que indica a possível transmissão durante a gravidez; essa probabilidade de transmissão depende do tempo de gestação.<sup>12</sup>

### **7.4 Transmissão por transfusão de sangue**

O vírus zika também pode ser transmitido por produtos derivados de sangue, no entanto a dose infecciosa para transmissão via transfusão e o efeito dos anticorpos na transmissibilidade não é ainda conhecida.<sup>14</sup> Para prevenir a transmissão é necessário reduzir o patogéneo dos produtos de sangue ou identificar os produtos infetados através de rastreio e removê-los de circulação. A tecnologia de remoção de patogeneos (PRT) mostrou-se eficaz a inativar o vírus das plaquetas, plasma e eritrócitos, contudo este método só pode ser usado após aférese. Assim é recomendado não doar sangue menos de 28 dias após viagem a locais endémicos.<sup>15</sup>

### **7.5 Transmissão por transplante de tecidos ou órgãos**

Apesar de ainda não ser conhecido nenhum caso, a transmissão por transplante de tecidos ou órgãos é sempre uma preocupação, particularmente devido ao largo período de

tempo em que ZIKV se mantém em tecidos reprodutivos e oculares. Outra preocupação também advém da falta de métodos para identificar contaminações.<sup>15</sup>

## 7.6 Transmissão por outras vias

Apesar de já ter sido detetado RNA viral e partículas infecciosas em leite materno, urina, saliva, lágrimas, LCR, humor aquoso, fluido conjuntival e esfregaços nasofaríngeos, não é possível obter informação suficiente acerca da associação destes fluidos à transmissão efetiva da infecção por vírus zika.<sup>25</sup>

## 8. Diagnóstico

Para que um ensaio possa ser usado como diagnóstico de zika, este tem que se submeter a uma autorização de uso de emergência (EUA) pela FDA (*Food and Drugs Administration*). A aprovação do ensaio tem que obedecer a certos critérios tais como preço acessível, sensibilidade, especificidade, rapidez, robustez, facilidade de uso e de transporte.<sup>25</sup> O ideal é ter métodos de diagnóstico que sejam sensíveis e específicos, não dispendiosos e sustentáveis.<sup>5</sup> Esses métodos têm que conseguir discriminar entre uma infecção primária e uma infecção secundária.<sup>25</sup> O diagnóstico não pode ser baseado apenas na avaliação clínica, uma vez que muitos arbovírus têm as mesmas manifestações clínicas. É usual realizar-se um hemograma mas, mesmo que este esteja alterado, nada é específico o suficiente para se identificar a infecção.<sup>13</sup>

### 8.1 Amostras

A escolha da amostra para análise é crítica na deteção do vírus. As amostras usadas com mais frequência para a deteção de RNA viral são o plasma e o soro.<sup>25</sup> Uma outra amostra que é muito utilizada e que permite uma deteção viral mais frequente, onde o RNA viral persiste por mais tempo que no soro, é a urina. Para manter a estabilidade da urina e evitar a sua degradação esta deve ser armazenada a 4°C e deve ser adicionado um estabilizante de ácidos nucleicos, de forma a diminuir o risco de degradação do RNA e de falsos negativos.

As orientações do CDC indicam que o ideal é testar sempre uma amostra de urina e outra de soro.<sup>25, 26</sup>

O uso de saliva para a detecção de RNA viral também está a ser avaliado, principalmente devido à sua fácil colheita, especialmente útil para neonatos e crianças pequenas. O RNA pode ser detetado logo no primeiro dia de sintomatologia e até 19 dias após o início dos sintomas.<sup>12</sup> Contudo, há muitas variações no método de colheita e dificuldade no processamento da amostra, e por isso este método não é muito usado em rotina.<sup>25</sup>

## **8.2 Diagnóstico pré-natal**

Ainda não está disponível nenhum tipo de diagnóstico pré-natal preciso da infecção fetal por zika. O uso do cordão umbilical como amostra não é aconselhado pois pode estar contaminado com sangue materno. A ecografia consegue detetar anomalias no SNC a partir das 19 semanas e identificar restrições no crescimento intrauterino (IUGR) às 18 semanas de gestação, criando um espaço de tempo razoável que permite identificar as anomalias.<sup>14</sup>

## **8.3 Diagnóstico neuroimagiológico**

A microcefalia pode ser detetada por tomografia computadorizada ou ressonância magnética.<sup>18</sup>

## **8.4 Isolamento do vírus**

Para a cultura *in vitro* do vírus podem-se usar linhas celulares de células Vero, de fígado de macacos rhesus, ou células com origem nos mosquitos *Aedes*. A dificuldade no isolamento do vírus é a manipulação de amostras com vírus infeccioso, pois isso requer biocontenção e infraestruturas próprias para prevenir a sua propagação para os manipuladores. No final, pode realizar-se um teste de inibição da hemaglutinina para confirmar a presença do vírus.<sup>18</sup>

## 8.5 Ensaios moleculares

Os métodos moleculares de detecção de RNA viral são a metodologia mais específica de diagnóstico (Tabela 1). Estes métodos são os preferidos para testar uma infecção por vírus zika durante a fase aguda da doença (menos de 7 dias após início sintomas).<sup>13</sup> Os testes serológicos não são recomendados durante esta fase aguda pois pode ainda não ter havido seroconversão.<sup>12</sup>

Tabela 1- Ensaios moleculares com autorização EUA para detecção de RNA viral de ZIKV (adaptado de THEEL, E. S. and HATA, D. J. Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update. *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018) <sup>25</sup>)

Nome do Ensaio Molecular	Amostra usada	Método	Alvo(s) Genético(s)
Trioplex rRT-PCR	ST, S, LCR, U, FA	RT-PCR (Taqman)	Envelope (ZIKV)
Zika Virus RNA Qualitative Real-Time RT-PCR	S, U	RT-PCR (Taqman)	Envelope e Membrana
RealStar Zika Virus RT-PCR Kit	S, U	RT-PCR (Taqman)	NSI
Aptima Zika Virus Assay	S, P, U	RT-PCR	NSI, NS4/NS5
Zika Virus Real-time RT-PCR Test	S, P, U	RT-PCR (Taqman)	NE
VERSAN Zika RNA 1.0 Assay (kPCR) kit	S, P, U	RT-PCR	NE
xMAP MultiFLEX™ Zika RNA Assay	S, P, U	RT-PCR	NE
Sentosa SA ZIKV RT-PCR Test	S, P, U	RT-PCR	NS4A
Zika Virus Detection by RT-PCR	S, P, U	RT-PCR	NE
RealTime ZIKA	ST, S, P, U	RT-PCR	Pré-Membrana, NS3
Zika ELITe MGB kit U.S	S, P	RT-PCR	NS3
Gene-RADAR Zika rRT-PCR	S	RT-PCR	NE
CII-ArboViroPlex rRT-PCR	S, U	RT-PCR	3'UTR
TaqPath Zika Virus Kit I	S, U	RT-PCR (Taqman)	NE

ST- sangue total; S- soro; LCR-líquido cefalorraquidiano; U-urina; FA- fluido amniótico; NE- não especificado

## 8.6 Ensaios Serológicos

Tabela 2- Ensaios serológicos com autorização EUA para detecção de Ac para ZIKV (adaptado de THEEL, E. S. and HATA, D. J. Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update. *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018) <sup>25</sup>)

Nome do Ensaio Molecular	Amostra usada	Método	Antígenos do vírus Zika
Zika MAC-ELISA	S	MAC-ELISA (colorimétrico)	Partículas tipo vírus zika recombinantes, não infecciosas
ZIKV Detect™ TM IgM Capture ELISA	S	MAC-ELISA (colorimétrico)	Envelope
LIAISON XL Zika IgM Assay	S	Imunoensaio de Captura de IgM (Quimioluminescência)	NSI
ADVIA Centaur Zika Test	S, P	Imunoensaio de Captura de IgM (Quimioluminescência)	NSI
DPP Zika IgM Assay System	ST, S, P	Imunocromatográfico	NSI

S- soro; P- plasma; ST- sangue total

A pesquisa de Ac anti-zika do tipo IgM é realizada por ensaios serológicos, e a presença de IgM é indicativa de infecção recente. A pesquisa destes Ac pode ser útil em indivíduos em que não foi detectado o RNA viral, no caso de o período de virémia já ter passado ou em casos de virémia muito baixa.<sup>26</sup> Para avaliar a presença de Ac neutralizantes, o método de referência é o PRNT, que apesar de ser complicado, é o que apresenta maior especificidade. Este ensaio é muito usado para confirmar resultados de testes serológicos.<sup>27</sup> Na tabela 2 observam-se os testes serológicos disponíveis. A recomendação da CDC consiste em realizar os testes moleculares nos primeiros dias após o início dos sintomas. Se o resultado de RT-PCR der negativo, ou se a doença se encontrar em convalescença, deve ser realizado um MAC-ELISA para detectar IgM. Se este teste der positivo, presume-se que se trata de uma infecção por zika, mas esta precisa de ser confirmada por um teste de PRNT.<sup>7</sup>

## 9. Razões para ocorrência dos surtos

Para compreender o surto, é importante saber alguns detalhes sobre o vetor. Em períodos de baixa transmissão o vírus é mantido entre NHP e mosquitos florestais. Durante os surtos, o vírus zika é mantido majoritariamente entre humanos e mosquitos *Aedes*.<sup>28</sup>

*Aedes aegypti* é um vetor muito “domesticado” que vive em associação com humanos e locais urbanos. *Aedes albopictus* é outro vetor muito invasivo com larga distribuição geográfica. Ambos são holometabolas (quatro estágios de vida) e os seus ovos eclodem quando submersos em água. Estes dois mosquitos vão frequentar os mesmos habitats e portanto vão competir. Os ovos de *Ae. aegypti* têm a vantagem de resistir a situações de extrema seca. Este mosquito prefere locais urbanos, gosta de se reproduzir em recipientes com água, perto de casas e tem os seus períodos de descanso dentro de habitações. O mosquito fêmea alimenta-se várias vezes de humanos, sendo provável a transmissão em cada refeição. O mosquito *Ae. albopictus* prefere locais mais resguardados e com mais espaços verdes, alimentando-se preferencialmente de animais domésticos.<sup>28</sup> Ambos picam majoritariamente durante o dia e a sua capacidade de transmitir o patógeno depende do local e do tempo.<sup>29</sup>

A competência do vetor é muito importante pois o mosquito tem que ser suscetível à infecção para a poder transmitir. Os mosquitos são suscetíveis a mudanças climáticas, pois são animais poiquilotérmicos, por isso condições como temperatura e precipitação afetam

os seus estádios de maturação. As mudanças antropogénicas aumentam os locais de procriação e contacto com humanos.<sup>28</sup> O aquecimento global também pode facilitar a propagação de infeções pois é um fator que afeta diretamente o vetor.<sup>29</sup>

Há várias razões que podem ter levado à rápida propagação do vírus zika. Uma das hipóteses é a entrada do vírus numa população imunologicamente *naïve*. Outra hipótese baseia-se nas alterações feitas pelo homem como desflorestação, construção rápida e não planeada, má gestão de resíduos, movimento de massas, agricultura intensiva entre outros, que alteraram os nichos ecológicos ocupados por estes mosquitos, o que teve impacto na sua biologia e os aproximou dos humanos.<sup>29, 27</sup>

A evolução adaptativa do vírus também é uma hipótese. É possível que a linhagem asiática, responsável pelo surto mais recente, se possa ter adaptado de forma a gerar níveis de virémia superiores em humanos, o que leva a uma maior eficiência na infeção, transmissão e propagação.<sup>5</sup> Como sabemos, os vírus de RNA têm taxas de mutação superiores e especula-se que o vírus zika tenha sofrido múltiplas mutações e recombinações genéticas, que tenham conduzido ao aparecimento de novas estirpes com maior capacidade de infetar humanos.<sup>27</sup>

## **10. Medidas de Prevenção**

As três potenciais medidas de prevenção são o controlo de vetores, terapêuticas e vacinação.

### **10.1 Controlo de Vetores**

As medidas de controlo de vetores podem ser divididas em medidas mecânicas, biológicas, químicas e de engenharia genética. As medidas preventivas mecânicas são as mais fáceis e mais económicas e incluem as medidas de proteção individuais como uso de roupas claras e compridas impregnadas de repelente, redes mosquiteiras nas janelas e uso de repelentes. Além disso incluem também a remoção de objetos que possam acumular água e manter ruas e edifícios limpos de modo a diminuir locais de reprodução indesejados.<sup>5</sup> É

necessária vigilância e monitorização de locais como aeroportos, albergues e outras portas de entrada, para impedir a propagação do mosquito.<sup>4</sup>

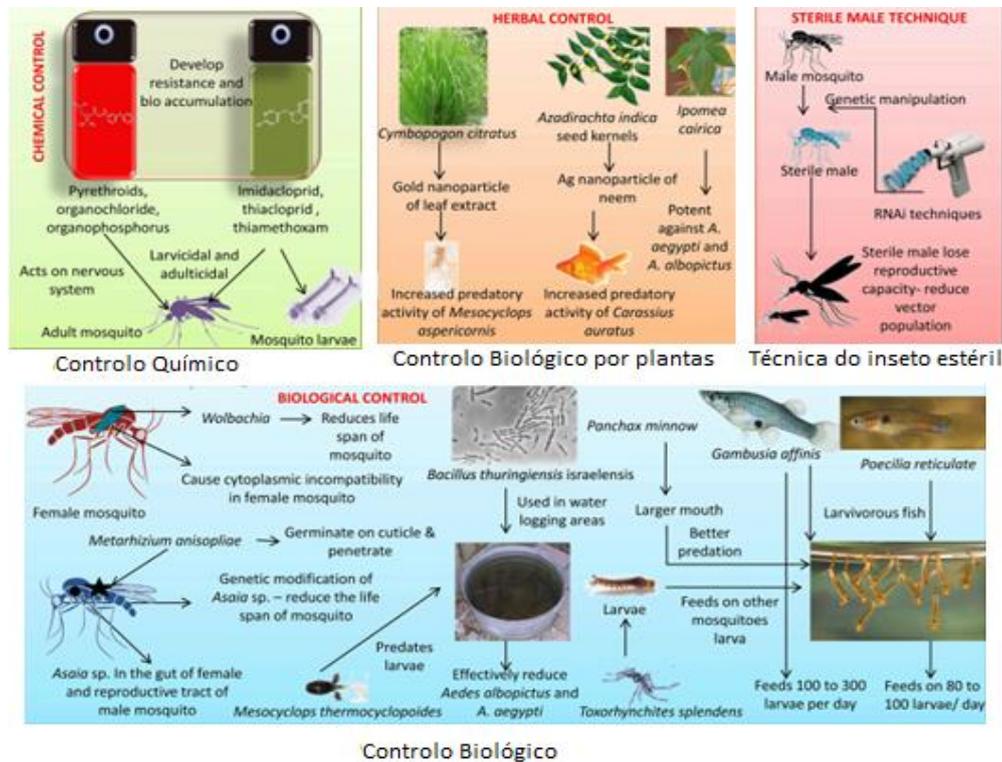


Figura 5- Estratégias de controlo do vetor para prevenir a transmissão de ZIKV (adaptado de SINGH, R. K., DHAMA, K., KHANDIA, R., MUNJAL, A., KARTHIK, K., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S., MALIK, Y. S. and BUENO-MARÍ, R. Prevention and control strategies to counter Zika virus, a special focus on intervention approaches against vector mosquitoes-Current updates. *Front. Microbiol.* **9**, (2018) <sup>4</sup>)

Como se pode verificar na figura anterior (Figura 5), as medidas de controlo químicas passam pela utilização de agentes químicos que atuam no sistema nervoso do mosquito e na própria larva, levando à erradicação destes. Para contrariar a resistência dos mosquitos e larvas ao uso de químicos, podem usar-se reguladores de crescimento que são larvicidas eficazes. No que diz respeito às medidas biológicas, elas incluem a utilização de animais (mosquitos, copépodes, peixes e girinos), plantas, bactérias e fungos. A utilização destes animais tem como objetivo a ingestão das larvas do mosquito, enquanto que as plantas e as bactérias produzem toxinas extremamente específicas que, ao serem consumidas pelas larvas, levam à sua morte. Relativamente à utilização de fungos, estes vão aderir e germinar na cutícula do mosquito, o que facilita a sua penetração e disseminação pelos vários órgãos do inseto, matando-o.<sup>4</sup>

As medidas preventivas baseadas na engenharia genética incluem a *sterile insect technique* (SIT) e a SIT modificada. A SIT modificada em vez de irradiação e quimioesterilização (usadas

na SIT), insere um transgene dominante letal (RIDL) na fase embrionária. Qualquer fêmea que acasale com um macho com o gene RIDL vai produzir descendência possuindo uma cópia desse gene. Este gene tem a particularidade de ser letal na espécie feminina. Um laboratório tentou criar uma versão melhorada deste gene, em que os mosquitos macho que apresentam este gene apenas sobrevivem em ambiente selvagem mediante uma dieta rica em tetraciclina. O gene *Ttav* (*tetracycline repressible transactivator variant*) é uma variante melhorada.<sup>28</sup> Assim, quando a descendência nasce, necessitam de tetraciclina para viver, o que a não acontecer, leva à sua morte. Todos os mosquitos alterados por estes métodos, apresentam menor expectativa de vida, fase de pupação retardada e adultos de menor tamanho e fraco desempenho.<sup>4</sup>

## 10.2 Antivirais

O tratamento profilático pode diminuir a propagação do vírus, sendo administrado apenas aos indivíduos com risco de infecção. O objetivo principal é reduzir a carga viral e os sintomas e proteger os fetos de sequelas neurológicas que afetem o desenvolvimento. Além disso, devido à persistência viral no trato reprodutivo masculino que permite a transmissão sexual, o agente antiviral deve atingir os locais onde o vírus está localizado de forma a eliminar a replicação viral e a transmissão sexual.<sup>30</sup>

Como a infecção normalmente é suave, a população prioritária a submeter a tratamento são as mulheres grávidas e os indivíduos com maior risco de complicações neurológicas. Porém, há múltiplas questões éticas no desenvolvimento de terapêuticas para usar durante a gravidez, pois as grávidas são um grupo populacional que normalmente está excluído de ensaios clínicos. Sendo assim o agente a ser usado deve ser de baixo risco para a mãe e para o feto e, acima de tudo, eficaz em prevenir os efeitos secundários no feto. Para além disso, o antiviral deve prático, nomeadamente no seu armazenamento e transporte, de forma a facilitar o seu uso em certas regiões mais desfavorecidas.<sup>6</sup> A avaliação inicial da eficácia é feita pela redução da virémia em doentes sem incluir mulheres grávidas. Para isso tem que se recrutar indivíduos com infecções iniciais por zika, de forma a avaliar a eficácia antiviral destes compostos. Doentes com infecção tardia não são ideais, pois já estarão com uma virémia reduzida. Como zika persiste no trato reprodutivo masculino, homens infetados também podem ser usados nesta fase. Assim que houver provas de sucesso nestes doentes, pode-se passar para a demonstração em mulheres grávidas.<sup>30</sup>

## 10.2.1 Moléculas antivirais inibidoras

Há duas estratégias para o desenvolvimento de moléculas antivirais. A primeira consiste em encontrar inibidores primários da infecção por vírus zika. A segunda consiste na reutilização de compostos já existentes, ou seja, com outras indicações terapêuticas. Recentemente está a aprofundar-se a reutilização de certos compostos já existentes que possam ser úteis para a infecção.<sup>31</sup>

Uma molécula ideal é aquela que tem biodisponibilidade oral aliada a boa eficácia e apresenta uma distribuição sistémica extensiva, pois zika aparenta infectar vários tecidos e órgãos. Como o tratamento de mulheres grávidas é o objetivo principal, o fármaco deve ter segurança e entrar na categoria de fármacos A/B para a gravidez, não impedindo o crescimento do feto. Além disso o composto usado não deve interferir com a resposta normal do SI. Apesar de ser uma ideia aliciante fazer um rastreio a fármacos já aprovados pela FDA e encontrar uma nova indicação para estes, há critérios que têm que ser assegurados, nomeadamente determinar se a concentração eficaz foi atingida nos doentes.<sup>30</sup>

Há duas categorias de moléculas inibidoras: os análogos dos nucleósidos/nucleótidos e os não análogos dos nucleósidos. Os análogos dos nucleósidos 7DMA, BCX4430, NITD008 (análogos da adenosina) e sofosbuvir (pró-fármaco da uridina) exibiram eficácia moderada *in vivo* e *in vitro*; contudo, nenhum destes foi capaz de prevenir totalmente a doença nem reduzir suficientemente a virémia. Uma das vantagens dos análogos dos nucleósidos/nucleótidos é o seu largo espectro antiviral para vírus relacionados, isto devido às suas regiões alvo conservadas das polimerases virais.<sup>30</sup>

Inibidores da categoria não análogos dos nucleósidos são identificados por rastreio baseados em células usando ensaios de infecção por zika. Foram identificados o antibiótico lipopeptídeo daptomicina, os antiparasitários niclosamida e ivermectin o fármaco antimalárico mefloquina, o imunossupressor ácido micofenólico, o fármaco para a náusea e vômitos palonosetron, o inibidor da pan-caspase 3 emricasan e o inibidor da síntese de pirimidina brequinar. Infelizmente nenhum destes compostos demonstrou eficácia *in vivo*.<sup>6, 30</sup> De momento não há nenhuma molécula antiviral inibidora em ensaios clínicos. Não se sabe ainda se a baixa eficácia destes antivirais se deve à sua baixa potência ou ao facto de serem administrados já tarde no percurso da doença.<sup>30</sup>

### **10.2.2 Anticorpos com potencial terapêutico para flavivírus**

Os anticorpos com potencial terapêutico têm vantagens relativamente às moléculas inibidoras, pois são mais específicos. Dessa forma e de maneira a diminuir a teratogenicidade, para a população materna os Ac monoclonais podem-se apresentar como uma opção mais viável relativamente às moléculas antivirais.<sup>32</sup> Estes Ac podem atuar por vários mecanismos, por exemplo ligam diretamente ao antígeno impedindo a ligação do patógeno ou modulam as funções efetoras dependentes de recetores Fc.<sup>11</sup>

Os Ac terapêuticos também têm alguns impedimentos à sua utilização. O primeiro problema é ADE, em que os Ac não neutralizantes facilitam a entrada do vírus em células com recetores FcγR.<sup>30</sup> Outra questão é a resistência dos flavivírus, pois estes rapidamente criam resistência. O que se pode fazer é usar pelo menos dois Ac em combinação ou combiná-los com terapêuticas tradicionais.<sup>11</sup> O terceiro impedimento é o custo, pois o manuseamento destes Ac é dispendioso e isso impede o seu uso alargado, particularmente em países com dificuldades económicas.<sup>30</sup>

## **10.3 Vacinas**

As vacinas são um dispositivo com boa relação custo-eficácia, que combatem doenças infecciosas. Estas devem desencadear uma imunidade a longo prazo e têm que ser baratas o suficiente para ser usadas globalmente, mesmo em países com baixos recursos.<sup>33</sup>

### **10.3.1 Estratégia de Desenvolvimento Clínico**

O objetivo final da vacina é estabelecer imunidade em rapazes e raparigas, antes que eles cheguem à idade fértil, de forma a haver imunidade total para homens e mulheres antes de uma possível gravidez. Assim que a vacina surgir, é essencial vacinar primeiro os grupos de risco e apenas quando estes grupos estiverem imunizados, é que se pode começar a vacinar a população jovem em geral. O ideal é imunizar as mulheres antes de elas ficarem grávidas, isto porque há riscos de SZC e aborto logo no primeiro trimestre de gravidez, e muitas mulheres não saberão ao certo que estão grávidas até esse primeiro trimestre. Além disso, a imunidade conferida pela vacinação é provável que leve algumas semanas a atingir o seu pico, o que deixaria o feto vulnerável à infeção durante uma fase crítica do seu desenvolvimento.<sup>34</sup>

### **10.3.2 Design do antígeno e abordagens para a entrega da vacina**

A durabilidade da imunidade conferida pela vacina deve ser apropriada para a população alvo. Por exemplo, uma vacina que induza uma imunidade curta é ideal para surtos, viajantes e mulheres que planeiam engravidar. Já a vacinação de adolescentes e crianças necessita de ser mais duradoura, de forma a serem evitadas múltiplas imunizações. O desenvolvimento de vacinas de vírus atenuados e de vacinas de vírus vivos inativados é um método mais lento devido à grande quantidade de vírus que se tem que produzir e ao aumento da segurança inerente a um processo que envolve um vírus vivo. Igualmente a vacina recombinante com subunidades de proteínas também requer grande desenvolvimento e, apesar de terem um bom perfil de segurança, é incerta a duração da resposta imune. Nestes casos pode ser necessária a adição de um adjuvante, o que levanta questões relativamente à segurança, o que acaba por significar mais tempo perdido no desenvolvimento.<sup>34</sup>

As vacinas de vírus inteiros mantêm uma conformação mais autêntica da partícula viral, e isto pode induzir Ac neutralizantes de maior qualidade comparando com as vacinas de subunidades, desde que o processo de inativação destes vírus inteiros não destrua os epitopos. Manter a integridade da partícula viral é importante para evitar respostas com o *fusion loop*, pois este tem mais probabilidade de reatividade cruzada com outros flavivírus, o que resulta numa menor atividade de proteção.<sup>34</sup> Independentemente do tipo de vacina, todas devem ter uma dose otimizada, um cronograma, uma forma de administração e a avaliação da imunogenicidade, eficácia e segurança.<sup>35</sup>

### **10.3.3 Modelos de infeção humana controlada**

Os modelos de infeção humana controlada (CHIM) são modelos em que indivíduos voluntários saudáveis são infetados com uma dose conhecida do patogeneo de interesse num ambiente controlado. Estes CHIM dão uma informação importante na determinação da vacina que confere um maior nível de proteção e que pode avançar para o desenvolvimento clínico, permitindo avaliar a eficácia de um candidato a vacina numa fase precoce do desenvolvimento, identificando vacinas com menor eficácia antes de se iniciarem os ensaios clínicos.<sup>36</sup><sup>24</sup> Como há recursos humanos e financeiros limitados, estes modelos vão permitir

aproveitar os recursos disponíveis para aquelas vacinas com mais potencial que apresentarem um elevado nível de proteção.<sup>36</sup>

Em qualquer ensaio, a prioridade é sempre a segurança dos participantes. Portanto, neste modelo não podem fazer parte as mulheres grávidas e, para diminuir o risco de transmissão por vetor, realizar os estudos CHIM em ambientes controlados. A demonstração da eficácia através de modelos CHIM não significa que a vacina seja muito eficaz nem garante a sua licença.<sup>36</sup>

### **10.3.4 Tipos de vacinas**

#### **Vacinas de vírus inativado purificado**

As vacinas de vírus inativado purificado (PIV) contêm partículas virais inteiras que foram inativadas, o que significa que não há possibilidade de reativação ou de replicação. A parte exterior do vírus mantém-se intacta de forma a ser reconhecida pelo sistema imune e induzir uma resposta imune. Devido à atenuação, vão ser necessárias mais imunizações para se ter uma proteção a longo prazo, havendo necessidade de um adjuvante. O vírus é inativado por formalina, purificado e formulado com alume para administração. O uso de adjuvante acaba por complicar o uso destas vacinas em grávidas.<sup>35</sup>

As vacinas PIV estão neste momento a ser testadas em vários ensaios de fase I, avaliando a segurança e imunogenicidade em indivíduos *naïves* e indivíduos já expostos a flavivírus.<sup>6</sup> Esta vacina induziu um bom nível de Ac neutralizantes em participantes humanos saudáveis, apresentando boa tolerância e efeitos secundários moderados a ligeiros.<sup>35</sup>

#### **Vacinas de vírus vivos atenuados**

Neste tipo de vacinas o vírus foi atenuado usando calor, manipulação química ou genética. Esta vacina vai induzir as respostas humoral e celular.<sup>4</sup> A produção destas vacinas requer um equilíbrio entre a imunogenicidade e a segurança. Isto pode ser explicado porque uma atenuação mais fraca vai criar uma resposta imune forte, mas pode causar virémia e neurovirulência, podendo sempre haver a possibilidade de reativação viral e infeção. Se o vírus for muito atenuado, há segurança mas vai induzir uma resposta fraca. Por estas razões, deve evitar-se este tipo de vacinas em mulheres grávidas e indivíduos imunocomprometidos,

sendo a população alvo adolescentes e crianças que ainda não atingiram a maturidade sexual.<sup>35</sup>

As vacinas quiméricas são uma versão das vivas atenuadas mas que usam sequências parciais de outros flavivírus.<sup>34</sup>

### **Vacinas de DNA**

As vacinas de DNA consistem numa sequência modificada de genes selecionados que codificam para proteínas do vírus zika, que vão ser clonados num plasmídeo. Esse plasmídeo vai ser injetado, permitindo à maquinaria endógena do hospedeiro produzir as proteínas alvo antigénicas.<sup>6</sup> O organismo vai induzir uma resposta imune a estes plasmídeos, que inclui Ac neutralizantes e células T, o que pode contribuir para uma proteção forte e duradoura. Estas vacinas não têm a partícula viral pelo que não há risco de infeção.<sup>37, 38</sup> Estas são facilmente produzidas, modificáveis e termoestáveis, o que vai permitir um fácil transporte e armazenamento.<sup>35</sup>

Foram testadas várias vacinas em murganhos, e o que se verificou foi que uma única imunização com vacinas de DNA que expressam para o gene prM/E induziram um maior título de Ac contra a proteína E do que uma vacina de DNA que codificava apenas para o gene E. Isto significa que prM é importante na imunogenicidade.<sup>6</sup>

A vacina quimérica candidata VRC5288 expressa o gene prM/E da estirpe da Polinésia que foi inserido na sequência genómica do vírus encefalite japonesa (JEV). Um segundo candidato, VRC5283, expressa a sequência prM/E completa otimizada, sem a modificação de JEV. Esta última já avançou para ensaios de fase 2, onde se avalia a segurança, imunogenicidade e também se estima a dose e a forma de libertação. Ambas as vacinas apresentam uma boa resposta humoral e celular contra as proteínas de Zika. Em ensaios com murganhos e NHP, ambas apresentaram imunogenicidade e VRC5283 preveniu a virémia mais eficazmente.<sup>34, 35</sup>

A vacina GLS-5700 consiste numa sequência de prM/E isolada de estirpes africana e asiática, clonadas no vetor pVaxI com uma sequência inicial de IgE para otimizar a expressão. Foram realizados ensaios e verificou-se uma imunização completa em murganhos A129 e NHP, quando administrada por eletroporação. Esta vacina já está em dois ensaios de fase I para adultos *naïves* e para adultos já expostos anteriormente.<sup>34, 35</sup>

## **Vacinas de RNA**

Nas vacinas de RNA, o RNA é sintetizado, modificado e incorporado na vacina. Estas vacinas contêm um *Open Reading Frame* que codifica o antígeno de interesse. Este mRNA vai ser traduzido diretamente em proteínas virais, usando a maquinaria celular do hospedeiro. Ao contrário da vacina de DNA, o mRNA não necessita de chegar ao núcleo para começar a transcrição, bastando chegar ao citoplasma, não ocorrendo por isso integração no genoma humano.<sup>6, 35</sup> Esta plataforma é muito versátil e permite a incorporação de variadas sequências e mutações.<sup>35</sup>

Recentemente foi estudada uma vacina em que se modificam os nucleósidos de mRNA, e esta expressa prM/E da estirpe da Polinésia Francesa estando encapsulada em nanopartículas lipídicas (LNP), o que facilita a biolibertação e a apresentação. A modificação nos nucleósidos serve para minimizar o reconhecimento do sistema imune inato e para melhorar a estabilidade, resultando numa maior magnitude e duração da produção de antígenos da vacina. Em estudos realizados com macacos rhesus, aqueles que foram vacinados com a vacina de mRNA encapsulado em nanopartículas lipídicas, mostraram ficar protegidos.<sup>34, 35</sup> Nesses NHPs, verificou-se que uma só imunização desta vacina induzia níveis de Ac cinquenta vezes maiores que modelos em que se realizou uma imunização de vacina de DNA e duas vezes maiores que modelos com duas imunizações de DNA.<sup>6</sup>

## **Vacinas Baseadas em Vetores**

Está ainda em fase de estudo uma nova classe de vacinas baseadas em vetores que expressam os genes de zika inseridos nestes vetores virais. Um exemplo é o adenovírus de rhesus do serotipo 52 (RHAd52), que serve como vetor e vai expressar os genes de zika inseridos. Estas vacinas induzem uma resposta antiviral e são fáceis de manipular.<sup>34, 35</sup>

Há uma vacina em estudo que protege contra várias doenças transmitidas por mosquitos, incluindo zika. Esta vacina ainda em investigação, denominada de AGS-v, está a ser desenvolvida com o objetivo de desencadear uma resposta imune às proteínas da saliva do mosquito. A vacina contém na sua composição quatro proteínas que estão presentes nas glândulas salivares do mosquito, e estas vão induzir Ac na pessoa vacinada e causar uma espécie de uma reação alérgica, o que pode prevenir infeção quando a pessoa for picada por

um mosquito que seja portador de alguma doença. Há suspeitas de que após a picada num indivíduo vacinado com AGS-v, o mosquito altere o seu comportamento, resultando numa baixa capacidade de reprodução e morte antecipada. Ou seja, seria uma vacina que não só protegeria das doenças como também ajudaria no controlo dos vetores.<sup>37, 38</sup>

A resposta ideal para uma terapia efetiva global é uma vacina de baixo custo, adequada para uso em larga escala, principalmente em países menos desenvolvidos. Outros tópicos que merecem atenção são a administração da vacina, a necessidade de cadeia de frio e o número de doses para a imunização.<sup>33</sup>

## **II. Considerações Finais**

Apesar de o vírus zika já ter sido descoberto há muitos anos, apenas recentemente se começou a compreender o seu efeito nos humanos. Só após a descoberta da associação com problemas congénitos ao nascimento e síndromes neurológicas debilitantes é que se sentiu a necessidade de juntar esforços para desenvolver vacinas e controlar a população de vetores. Devido à livre circulação de pessoas e materiais, este vírus pode-se espalhar para locais não endémicos, continuando a sua transmissão em locais onde se encontrem vetores competentes.

Apesar de vários anos de estudos, há ainda aspetos pouco claros, como certas características dos vetores, da biologia do vírus, epidemiologia e patogénese. Além disso, os mecanismos das sequelas neurológicas não são ainda compreendidos na sua totalidade. O diagnóstico continua ainda longe do padrão de qualidade desejado e, apesar de já haver testes disponíveis, estes são em número limitado e de baixa disponibilidade em locais endémicos, onde é mais difícil obter as infraestruturas e capacidade. Há uma necessidade contínua de avaliação destes métodos moleculares e serológicos até que novos métodos sejam desenvolvidos.

As terapias usando anticorpos bem como várias moléculas antivirais, já demonstraram eficácia mas ainda nenhuma entrou em desenvolvimento clínico. Isto deve-se a impedimentos relacionados com a segurança e custos associados. Relativamente às vacinas, muitas já se encontram em fases pré-clínicas e em ensaios clínicos e é esperado que possam ser comercializadas num curto espaço de tempo, de forma a prevenir a infeção por zika.

À medida que se vai compreendendo melhor a patogénese do vírus e a sua genética, é possível identificar novos alvos para desenvolver compostos e fármacos eficazes além de vacinas que previnam eficazmente a infeção por ZIKV. Estudos constantes, com a ajuda de modelos animais, vão também oferecer uma melhor visão e um estímulo para novas estratégias de prevenção. É essencial a colaboração entre as várias partes envolvidas, médicos, pessoal de laboratório e investigadores, de forma a otimizar a deteção e o tratamento de doentes infetados. Mais importante ainda é a necessidade de vigilância e monitorização de forma a prevenir novas emergências devido a zika no futuro.

## Referências Bibliográficas

1. MORENS, D. M. and FAUCI, A. S. - **Pandemic Zika: A Formidable Challenge to Medicine and Public Health.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S857–S859.
2. **CDC - NIOSH - Mosquito-Borne Diseases.** Disponível em: <https://www.cdc.gov/niosh/topics/outdoor/mosquito-borne/default.html> (Visitado a 7 de agosto 2018)
3. **Arbovirus - an overview** | ScienceDirect Topics. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/topics/immunology-and-microbiology/arbovirus> (Visitado a 7 de agosto 2018)
4. SINGH, R. K., DHAMA, K., KHANDIA, R., MUNJAL, A., KARTHIK, K., TIWARI, R., CHAKRABORTY, S., MALIK, Y. S. and BUENO-MARÍ, R. - **Prevention and control strategies to counter Zika virus, a special focus on intervention approaches against vector mosquitoes-Current updates.** *Front. Microbiol.* **9**, (2018).
5. GUBLER, D. J., VASILAKIS, N. and MUSSO, D. - **History and Emergence of Zika Virus.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S860–S867.
6. MCARTHUR, M. A. - **Zika Virus: Recent Advances towards the Development of Vaccines and Therapeutics.** *Viruses* **9**, (2017).
7. ESPOSITO, D. L. A. and MORAES, J. B. DE. - **Current priorities in the Zika response.** (2017) 1–8 doi:10.1111/imm.12878.
8. MORENS, D. M. and FAUCI, A. S. - **Pandemic Zika: A Formidable Challenge to Medicine and Public Health.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S857–S859.
9. HILLS, S. L., FISCHER, M. and PETERSEN, L. R. - **Epidemiology of Zika Virus Infection.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S868–S874.
10. SIROHI, D. and KUHN, R. J. - **Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S935–S944.
11. SUN, H., CHEN, Q. and LAI, H. - **Development of antibody therapeutics against flaviviruses.** *Int. J. Mol. Sci.* **19**, (2018).
12. PLOURDE, A. R. and BLOCH, E. M. - **A Literature Review of Zika Virus.** **22**, (2016) 1185–1192.
13. MITTAL, R., NGUYEN, D., DEBS, L. H., PATEL, A. P., LIU, G., JHAVERI, V. M., S. KAY, S.-I.,

- MITTAL, J., BANDSTRA, E. S., YOUNIS, R. T., CHAPAGAIN, P., JAYAWEEERA, D. T. and LIU, X. Z. - **Zika Virus: An Emerging Global Health Threat.** *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **7**, (2017).
14. ZORRILLA, C. D., GARCÍA GARCÍA, I., GARCÍA FRAGOSO, L. and DE LA VEGA, A. - **Zika Virus Infection in Pregnancy: Maternal, Fetal, and Neonatal Considerations.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S891–S896.
  15. GREGORY, C. J., ODUYEBO, T., BRAULT, A. C., BROOKS, J. T., CHUNG, K. W., HILLS, S., KUEHNERT, M. J., MEAD, P., MEANEY-DELMAN, D., RABE, I., STAPLES, E. and PETERSEN, L. R. - **Modes of Transmission of Zika Virus.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S875–S883.
  16. OSUNA, C. E. and WHITNEY, J. B. - **Nonhuman Primate Models of Zika Virus Infection, Immunity, and Therapeutic Development.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S928–S934.
  17. JULANDER, J. G. and SIDDHARTHAN, V. - **Small-Animal Models of Zika Virus.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S919–S927.
  18. SINGH, R. K., DHAMA, K., KARTHIK, K., TIWARI, R., KHANDIA, R., MUNJAL, A., IQBAL, H. M. N., MALIK, Y. S. and BUENO-MARÍ, R. - **Advances in diagnosis, surveillance, and monitoring of zika virus: An update.** *Front. Microbiol.* **8**, (2018) 1–17.
  19. MUÑOZ, L. S., PARRA, B. and PARDO, C. A. - **Neurological Implications of Zika Virus Infection in Adults.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S897–S905.
  20. PRIYAMVADA, L., SUTHAR, M. S., AHMED, R. and WRAMMERT, J. - **Humoral Immune Responses Against Zika Virus Infection and the Importance of Preexisting Flavivirus Immunity.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S906–S911.
  21. LI, R., DING, J., DING, G., FAN, X., HE, Y., WANG, X., ZHANG, H., JI, J. and LI, H. - **Zika virus infections, a review.** *Radiol. Infect. Dis.* **4**, (2017) 88–93.
  22. DA SILVA PONE, M. V., MOURA PONE, S., ARAUJO ZIN, A., BARROS MENDES, P. H., SENRA AIBE, M., BARROSO DE AGUIAR, E. and DE OLIVEIRA GOMES DA SILVA, T. - **Zika virus infection in children: epidemiology and clinical manifestations.** *Child's Nerv. Syst.* **34**, (2018) 63–71.
  23. DUARTE, G. - **Challenges of Zika Virus Infection in Pregnant Women**  
**Desafios da infecção pelo vírus Zika em gestantes.** (2016) 263–265  
doi:10.1055/s-0036-1584206.

24. DURBIN, A. P. and WHITEHEAD, S. S. - **Zika Vaccines: Role for Controlled Human Infection.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S971–S975.
25. THEEL, E. S. and HATA, D. J. - **Diagnostic Testing for Zika Virus: a Postoutbreak Update.** *J. Clin. Microbiol.* **56**, (2018).
26. MUNOZ-JORDAN, J. L. - **Diagnosis of Zika Virus Infections: Challenges and Opportunities.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S951–S956.
27. MUSTAFA, M. S. and RAMASETHU, R. - **Zika: An enormous public health challenge for a miniscule virus.** *Med. J. Armed Forces India* **74**, (2018) 61–64.
28. KAUFFMAN, E. B. and KRAMER, L. D. - **Zika Virus Mosquito Vectors: Competence, Biology, and Vector Control.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S976–S990.
29. PAIXÃO, E. S., TEIXEIRA, M. G. and RODRIGUES, L. C. - **Zika, chikungunya and dengue: the causes and threats of new and re-emerging arboviral diseases.** *BMJ Glob. Heal.* **2**, (2017) e000530.
30. XIE, X., ZOU, J., SHAN, C. and SHI, P. Y. - **Small Molecules and Antibodies for Zika Therapy.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S945–S950.
31. SHAN, C., XIE, X., BARRETT, A. D. T., GARCIA-BLANCO, M. A., TESH, R. B., VASCONCELOS, P. F. DA C., VASILAKIS, N., WEAVER, S. C. and SHI, P.-Y. - **Zika Virus: Diagnosis, Therapeutics, and Vaccine.** *ACS Infect. Dis.* **2**, (2016) 170–172.
32. ERBELDING, E. and CASSETTI, C. - **Zika Virus and Future Research Directions.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S991–S994.
33. POLAND, G. A., KENNEDY, R. B., OVSYANNIKOVA, I. G., PALACIOS, R., HO, P. L. and KALIL, J. - **Development of vaccines against Zika virus.** *Lancet Infect. Dis.* **18**, (2018) e211–e219.
34. MORABITO, K. M. and GRAHAM, B. S. - **Zika Virus Vaccine Development.** **216**, (2018) 957–963.
35. MAKHLUF, H. and SHRESTA, S. - **Development of Zika Virus Vaccines.** *Vaccines* **6**, (2018)7.
36. GRUBER, M. F., FARIZO, K. M., PRATT, R. D., FINK, D. L., FINN, T. M., KRAUSE, P. R., BORIO, L. L. and MARKS, P. W. - **Clinical Development Strategies and Considerations for Zika Vaccine Licensure.** *J. Infect. Dis.* **216**, (2017) S964–S970.

37. **Phase 2 Zika Vaccine Trial Begins in U.S., Central and South America** | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/phase-2-zika-vaccine-trial-begins-us-central-and-south-america> (Visitado a 9 de agosto 2018)
38. **NIH Begins Testing Investigational Zika Vaccine in Humans** | NIH: National Institute of Allergy and Infectious Diseases. Disponível em: <https://www.niaid.nih.gov/news-events/nih-begins-testing-investigational-zika-vaccine-humans> (Visitado a 10 de agosto 2018).