

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

Instituto de Ciências Biológicas

Departamento de Genética, Ecologia e Evolução

Programa de Pós-Graduação em Genética

Diego Menezes Bonfim

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS (ZIKV) EM
GLIOBLASTOMA (GBM)**

Belo Horizonte

2025

Diego Menezes Bonfim

**CARACTERIZAÇÃO MOLECULAR DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS (ZIKV) EM
GLIOBLASTOMA (GBM)**

Tese submetida ao programa de Pós-graduação
em Genética da Universidade Federal de Minas
Gerais como requisito parcial para a obtenção do
título de Doutor em Genética.

Orientador: Dr. Renato Santana de Aguiar

Belo Horizonte

2025

043

Bonfim, Diego Menezes.

Caracterização molecular da infecção por Zika Vírus (ZIKV) em Glioblastoma (GBM) [manuscrito] / Diego Menezes Bonfim. – 2025.

137 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientador: Dr. Renato Santana de Aguiar.

Tese (doutorado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Genética.

1. Genética. 2. Zika virus. 3. Glioblastoma. 4. Vírus Oncolíticos. 5. Transcriptoma. I. Aguiar, Renato Santana de. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 575



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
ICB - COLEGIADO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA - SECRETARIA

ATA DE DEFESA DE TESE

DIEGO MENEZES BONFIM	199/2025 ENTRADA 2º/2021
----------------------	-----------------------------

Às dez horas do dia **27 de novembro de 2025**, reuniu-se a Comissão Examinadora de Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado: "**Caracterização Molecular da Infecção por Zika Vírus (zika) em Glioblastoma Multiforme (gbm)**", requisito para obtenção do grau de Doutor em **Genética**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, **Dr. Renato Santana de Aguiar**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra ao candidato, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos Examinadores, com a respectiva defesa do candidato. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença do candidato e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dr. Renato Santana de Aguiar	UFMG	Aprovado
Dra. Erika Cristina Jorge	UFMG	Aprovado
Dr. Marcelo Rizzatti Luizson	UFMG	Aprovado
Dr. Fabio de Almeida Mendes	UFRJ	Aprovado
Dra. Patrícia Garcez	UFRJ	Aprovado

Pelas indicações, o candidato foi considerado: **APROVADO**

O resultado final foi comunicado publicamente ao candidato pelo Presidente da Comissão. Nada

mais havendo a tratar, o Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora.

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2025.

Dr. Renato Santana de Aguiar - Orientador

Dra. Erika Cristina Jorge

Dr. Marcelo Rizzatti Luizon

Dr. Fabio de Almeida Mendes

Dra. Patrícia Garcez

Assinatura dos membros da banca examinadora:



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 14:18, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rizzatti Luizon, Professor do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 03/12/2025, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio de Almeida Mendes, Usuário Externo**, em 05/12/2025, às 12:24, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Pestana Garcez, Usuária Externa**, em 09/12/2025, às 11:16, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **4774596** e o código CRC **95BBB666**.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

"Caracterização Molecular da Infecção por Zika Vírus (zikv) em Glioblastoma Multiforme (gbm)"

Diego Menezes Bonfim

Tese aprovada pela banca examinadora constituída pelos Professores:

Prof. Renato Santana de Aguiar - Orientador
UFMG

Profa Erika Cristina Jorge
UFMG

Prof. Marcelo Rizzatti Luizon
UFMG

Prof. Fabio de Almeida Mendes
UFRJ

Profa Patrícia Garcez

Belo Horizonte, 27 de novembro de 2025.



Documento assinado eletronicamente por **Erika Cristina Jorge, Professora do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 14:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Marcelo Rizzatti Luizon, Professor do Magistério Superior**, em 27/11/2025, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renato Santana de Aguiar, Professor do Magistério Superior**, em 03/12/2025, às 10:13, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Fabio de Almeida Mendes, Usuário Externo**, em 05/12/2025, às 12:23, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Patricia Pestana Garcez, Usuária Externa**, em 09/12/2025, às 11:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.ufmg.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador 4774667 e o código CRC 1DBBE0C1.

Ao meu querido pai, Ernane, de bendita memória, que viu este trabalho germinar, mas, pela infeliz aleatoriedade da vida, não poderá colher os frutos ao meu lado. Minha alegria é saber que seu legado vive em minha psique, assim como sua essência vive em mim, pela impressionante força da genética.

E ao meu filho, Álvaro, que me lembra todos os dias dessa imortalidade.

AGRADECIMENTOS

AO VERDADEIRO EU,

À minha esposa querida, Cíntia, que além de ser fonte contínua de amor, paciência e acolhimento e de quem procedem inúmeras outras virtudes sem as quais este trabalho jamais seria realizado, me orienta, discute e troca experiências acadêmicas comigo, como uma boa colega de profissão.

Ao meu irmão, Tiago. Que sua inteligência, integridade e senso de empatia elevadas possam construir um mundo melhor para todos nós.

À minha mãe, Petrânia, de quem busquei a herança dos Teles de Menezes: A incapacidade de aceitar a realidade imposta, confrontando-a com toda a força da alma para transformá-la, quando necessário.

Ao meu orientador, Renato, fonte perpétua de inspiração por irradiar constantemente o brilho nos olhos de quem é apaixonado pelo que faz. Desejo a nós longos anos de parceria no campo empolgante da biotecnologia.

Ao meu chefe, Renan, que desde que me conheceu faz o possível e o impossível para levar em conta meus anseios de carreira, proporcionando o melhor ambiente de trabalho possível. E por inculcar em mim a necessidade de “quebrar a cabeça” até chegar no modelo estatístico ideal para o dado. Espero ter tido sucesso em refletir esta ânsia no presente trabalho.

À equipe da cultura de células LBI: Fernanda Gil, Fernanda Marim, Daniel, Fran, Aryel e Victor. Dispensados todos os clichês, sem vocês literalmente este trabalho não seria possível.

Ao meu amigo, João Locke, pelo amplo leque de conselhos e dicas, que vão desde trâmites acadêmicos a análises estatísticas e expectativas na carreira. Sucesso sempre!

Ao meu amigo Pedro Drummond e ao meu primo Breno Menezes, pela disponibilização das ferramentas necessárias à conclusão deste trabalho.

“(...) Portanto, cada pessoa deve dizer a si mesma: “בשבילי נברא העולם” - O Universo foi criado para mim.”.

Talmud

“(...) Esta é uma verdade que ainda me enche de assombro. Embora sejamos mortais, nossos genes são potencialmente imortais.”

Richard Dawkins

“Nada é verdadeiro, tudo é permitido”

Fyodor Dostoyevsky

RESUMO

O glioblastoma (GBM) é um tumor maligno decorrente da diferenciação de astrócitos. Com sobrevida média de apenas dois anos após o diagnóstico, trata-se do tumor cerebral mais comum e agressivo, responsável por 80% das neoplasias malignas do sistema nervoso central (SNC). Sem cura, seu tratamento baseia-se em ressecção cirúrgica seguida de quimio- e radioterapia associadas a medidas paliativas. Diante desse cenário limitado, terapias direcionais emergem como estratégias promissoras, incluindo a busca por alvos imunoterápicos, como o receptor de membrana *PTPRZI*, associado ao desenvolvimento tumoral, e o uso de vírus oncolíticos capazes de infectar e destruir seletivamente células neoplásicas. A compreensão da interação vírus-tumor é, portanto, essencial para o avanço dessas abordagens. O objetivo desta tese foi caracterizar os genes, vias celulares e fatores epitranscritômicos modulados pela infecção do Zika Vírus (ZIKV; *Flavivirus*, *Flaviviridae*) em células de GBM. No Capítulo 1, realizou-se uma revisão sistemática e uma meta-análise funcional dos estudos publicados até 5 de março de 2025 que caracterizaram o perfil transcriptômico de células de GBM infectadas por ZIKV. Dos 139 registros identificados, cinco atenderam aos critérios de elegibilidade (estudos primários de acesso aberto que avaliaram genes diferencialmente expressos - DEGs - em modelos de GBM infectados com ZIKV selvagem ou modificado, utilizando abordagens transcriptômicas). Foram identificados 4.360 genes com expressão aumentada e 2.072 reduzida, sendo doze (*DNAJB9*, *SESN2*, *PMAIP1*, *PPP1R15A*, *KLF4*, *ATF3*, *IFNB1*, *IFNL1*, *ANKRD33B*, *ZC3HAV1*, *OASL* e *CCL5*) superexpressos em todos os estudos. A análise funcional revelou 23 vias celulares recorrentes, majoritariamente associadas à resposta imune inata mediada por interferons dos tipos I e III. Entretanto, a heterogeneidade metodológica e a incompletude no relato limitaram a comparabilidade entre estudos, reforçando a necessidade de maior padronização. No Capítulo 2, caracterizaram-se o transcriptoma e o epitranscriptoma da linhagem U-87MG infectada com a cepa PE243 do ZIKV, por meio de sequenciamento direto de RNA. Foram identificados 21 DEGs, sendo 17: *IFIT2*, *CCL5*, *RSAD2*, *CXCL10*, *OASL*, *CXCL8*, *H3C4*, *CXCL11*, *IFIT1*, *RAET1L*, *IL7R*, *CXCL1*, *IFNL1*, *H4C16*, *HLA-DOB*, *ACTN2*, *RND1* e *EXOSC4*, além do RNA *ENSG00000286610* com expressão aumentada. O gene *CCDC85A* e o RNA *RN7SL731P* foram os únicos alvos que apresentaram expressão reduzida. Quanto aos transcritos diferencialmente expressos, identificaram-se 1.302, número 64 vezes superior ao de DEGs, evidenciando o papel central do splicing alternativo na resposta celular à infecção. Ademais, foram descritas pela primeira vez modificações epitranscritômicas - N6-metiladenosina (m⁶A), 5-metilcitosina (m⁵C), pseudouridina (pseU) e inosina (I) - moduladas pela infecção em células de GBM. Vários genes exibiram alterações concordantes

entre suas isoformas: *RPLP1*, *RPL15* e *RPL8* foram consistentemente superexpressos, indicando regulação coordenada de componentes ribossomais e sugerindo reprogramação translacional induzida pelo ZIKV. No Capítulo 3, investigou-se a participação do receptor *PTPRZ1*, expresso em GBM e associado ao prognóstico tumoral, na entrada e infectividade do ZIKV. Um ensaio de cinética viral com quantificação por RT-qPCR sugeriu inicialmente indução transcricional deste gene durante a infecção; entretanto, experimentos subsequentes de bloqueio e competição excluíram seu papel como receptor de entrada para o vírus em modelos de GBM. Em conjunto, os achados desta tese contribuem para o entendimento dos mecanismos moleculares da interação entre ZIKV e GBM, demonstrando alterações robustas no transcriptoma e no epitranscriptoma, acompanhadas de ativação de vias imunes, sem evidências de envolvimento funcional do receptor *PTPRZ1* neste contexto. Esses resultados fornecem bases para futuras pesquisas voltadas à identificação de alvos potenciais para o desenvolvimento de terapias oncolíticas para glioblastomas.

Palavras-chave: Zika Vírus; Glioblastoma; vírus oncolíticos; transcriptoma; epitranscriptoma; *PTPRZ1*

ABSTRACT

Glioblastoma (GBM) is a malignant tumor arising from astrocytic differentiation. With a mean survival of only two years after diagnosis, it is the most common and aggressive primary brain tumor, accounting for 80% of malignant neoplasms of the central nervous system (CNS). In the absence of curative treatment, current therapeutic strategies rely on surgical resection followed by chemo- and radiotherapy combined with palliative care. Given this limited scenario, targeted therapies have emerged as promising alternatives, including the search for immunotherapeutic targets, such as the membrane receptor *PTPRZ1*, implicated in GBM development, and the investigation of oncolytic viruses capable of selectively infecting and destroying tumor cells. Advancing such approaches requires a detailed understanding of virus–tumor interactions. The aim of this thesis was to characterize the genes, cellular pathways, and epitranscriptomic factors modulated by Zika virus (ZIKV; *Flavivirus*, *Flaviviridae*) infection in GBM cells. In Chapter 1, a systematic review and functional meta-analysis of biological pathways was conducted for studies published up to March 5th, 2025, characterizing the transcriptomic profile of ZIKV-infected GBM cells. Of the 139 records identified, five met the eligibility criteria (open-access primary studies assessing differentially expressed genes - DEGs - in GBM models infected with wild-type or engineered ZIKV using transcriptomic approaches). Across studies, 4,360 genes were reported as upregulated and 2,072 as downregulated, with twelve genes (*DNAJB9*, *SESN2*, *PMAIP1*, *PPP1R15A*, *KLF4*, *ATF3*, *IFNB1*, *IFNL1*, *ANKRD33B*, *ZC3HAV1*, *OASL*, and *CCL5*) consistently overexpressed in all datasets. Functional analysis revealed 23 commonly activated pathways, predominantly linked to innate immune responses mediated by type I and type III interferons. However, methodological heterogeneity and incomplete reporting limited the comparability across studies, underscoring the need for standardization. In Chapter 2, the transcriptome and epitranscriptome of the U-87MG cell line infected with the ZIKV strain PE243 were characterized using direct RNA sequencing. Twenty-one DEGs were identified, being 17: *IFIT2*, *CCL5*, *RSAD2*, *CXCL10*, *OASL*, *CXCL8*, *H3C4*, *CXCL11*, *IFIT1*, *RAET1L*, *IL7R*, *CXCL1*, *IFNL1*, *H4C16*, *HLA-DOB*, *ACTN2*, *RND1*, *EXOSC4*, and the RNA *ENSG00000286610* all upregulated. Only the gene *CCDC85A* and the RNA *RN7SL731P* appeared as downregulated. A total of 1,302 differentially expressed transcripts were detected, a number 64-fold greater than the DEGs, highlighting the central role of alternative splicing in shaping the cellular response to infection. Epitranscriptomic analyses revealed, for the first time in GBM cells, ZIKV-induced changes in N6-methyladenosine (m⁶A), 5-methylcytosine (m⁵C), pseudouridine (pseU), and inosine (I). Several genes exhibited concordant isoform-level

regulation: *RPLP1*, *RPL15*, and *RPL8* were consistently upregulated, indicating coordinated modulation of ribosomal components and suggesting ZIKV-induced translational reprogramming. In Chapter 3, the role of the cellular receptor *PTPRZ1*, expressed in GBM and associated with tumor prognosis, was investigated in the context of ZIKV infection. A viral kinetics assay with RT-qPCR quantification initially suggested transcriptional induction of *PTPRZ1* during infection; however, subsequent blocking and competition experiments excluded this receptor as a mediator of viral entry or infectivity in GBM models. Taken together, the findings of this thesis advance the understanding of the molecular mechanisms underlying the interaction between ZIKV and GBM, revealing robust alterations in the transcriptome and epitranscriptome, coupled with activation of immune pathways, without evidence supporting a functional role for *PTPRZ1* in this context. These results provide a foundation for future research aimed at identifying candidate targets for ZIKV-based oncolytic strategies in glioblastoma therapy.

Keywords: Zika Virus; Glioblastoma; oncolytic viruses; transcriptome; epitranscriptome; *PTPRZ1*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ressonância magnética de imagem (RMI) do cérebro de paciente apresentando GBM.....	20
Figura 2 - Reconstrução filogenética dos flavivírus de importância médica.....	29
Figura 3 - Desenho esquemático da estrutura do genoma do ZIKV.....	31
Figura 4 - Estrutura do genoma do ZIKV.....	32
Figura 5 - Filogenia das cepas do ZIKV com base em regiões recombinantes e não-recombinantes.....	35
Figura 6 - Esquema representativo do ciclo replicativo do ZIKV.....	37
Figura 7 - SYRCLE's Risk of Bias (RoB) tool evaluation matrix.....	55
Figura 8 - Differentially Expressed Genes (DEGs) in ZIKV-infected human GBM cells.....	56
Figura 9 - Concordant enrichment of Gene Ontology Biological Processes (GO:BP) across three ZIKV-infected GBM datasets.....	58
Figura 10 - Experimental design of the transcriptomic profiling of ZIKV infection in GBM cells.....	72
Figura 11 - Workflow for isoform and RNA modification analysis.....	74
Figura 12 - Determination and validation of the working MOI for ZIKV infection in U-87MG cells.....	75
Figura 13 - Differential gene expression in ZIKV-infected U-87MG cells.....	76
Figura 14 - Differential transcript expression in ZIKV-infected U-87MG cells.....	77
Figura 15 - Heatmap of $\log_2FC > 2$ isoforms with only genes that have more than 2 isoforms DE.....	78
Figura 16 - Differentially expressed isoforms detected across long- and short-read sequencing.....	80
Figura 17 - RNA modification dynamics in ZIKV-infected U-87MG cells.....	81
Figura 18 - ZIKV growth curve associated with <i>PTPRZ1</i> expression.....	90
Figura 19 - Flow cytometry analysis of <i>PTPRZ1</i> surface expression in U-87 MG cells.....	91

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Protocolos de ensaio clínico de viroterapias oncolíticas aplicáveis em GBM.....	27
Tabela 2 - Genômica funcional do ZIKV.....	33
Tabela 3 - Summary of experimental parameters and outcomes reported in the included studies.....	50

LISTA DE ABREVIACÕES

DENV - Vírus Da Dengue

DEGs - Genes Diferencialmente Expressos

GBM - Glioblastoma

I - inosina

m⁵C - 5-metilcitosina

m⁶A - N6-metiladenosina

NS5 - Proteína Não-Estrutural 5

OMS - Organização Mundial De Saúde

pseU - pseudouridina

RT-qPCR - Retrotranscrição Seguida De Reação Em Cadeia Da Polimerase Quantitativa

SNC - Sistema Nervoso Central

WNV - Vírus Do Oeste Do Nilo

YFV - Vírus Da Febre Amarela

ZIKV - Zika Vírus

SUMÁRIO

1.	Introdução.....	18
1.1.	Glioblastoma (GBM).....	18
1.2.	Vírus Oncolíticos.....	22
1.3.	Zika vírus (ZIKV).....	29
2.	Objetivos.....	42
3.	Prólogo.....	43
4.	Capítulo 1.....	44
	Transcriptomic Profile of Glioblastoma Multiforme (GBM) Cells Infected with Zika Virus (ZIKV): A Systematic Review and Pathway Analysis.....	45
5.	Capítulo 2.....	67
	Zika virus infection shapes the transcriptomic and epitranscriptomic landscape in glioblastoma.....	68
6.	Capítulo 3.....	88
	Short communication: Low Expression of the Membrane Receptor <i>PTPRZ1</i> and Lack of Evidence for Its Role in Zika Virus Infection of the Glioblastoma Cell Line U-87 MG.....	89
7.	Discussão.....	93
8.	Conclusão.....	98
	Referências Bibliográficas.....	99
	ANEXO I – Metodologia e protocolo dos experimentos realizados nos Capítulos 2 e 3...109	
	ANEXO II – ToxRTool adaptado para o contexto do Capítulo 2.....125	
	ANEXO III – Trabalhos produzidos no interstício do doutorado.....127	

1. Introdução

1.1. Glioblastoma (GBM)

Conforme revisado por Stoyanov & Dzhenkov (2018), a descrição de tumores do SNC se faz presente na literatura desde o fim do século 18. Naturalmente, o nível de precisão no detalhamento destes primeiros relatos reflete a evolução científica do campo à época. Em trabalhos independentes, Berns (1800) e Abernety (1804) descreveram de maneira quase simultânea amostras humanas de material obtido via autópsia endocraniana como “uma formação de tumores difusos no sistema nervoso central que não apresentam uma barreira física evidente entre tecido saudável e tecido tumoral, apesar de serem tecidos distintos”. Diferentes nomenclaturas foram atribuídas a estes achados: ‘Sarcoma medular’, ‘Encefaloide’ e ‘*Fungus Medullare*’ são encontrados na literatura médica contemporânea a estas descrições. (STOYANOV; DZHENKOV, 2018). Estes relatos de caso inauguraram o campo da neuro-oncologia, que se desenvolveu em saltos até chegar aos enquadramentos modernos dos diferentes tipos de carcinomas encefálicos.

Em se tratando de tumores do SNC que se desenvolvem em tecido não-neuronal, o primeiro relato encontrado na literatura é o do patologista alemão Rudolf Virchow, em 1865, que descreveu formações tumorais originadas a partir de células da glia que apresentavam diferenças notórias em comparação ao tecido saudável tanto a nível tecidual como celular. Virchow foi o primeiro a cunhar o termo ‘glioma’, que persiste na literatura neuro-oncológica até o presente momento (DE ANGELIS; MELLINGHOFF, 2011). Por fim, 61 anos após esta descoberta, Bailey e Cushing (1926) descreveram de maneira detalhada o que viria a ser um dos mais desafiadores carcinomas do SNC, chamando-o de ‘Spongioblastoma multiforme’, nomenclatura que seria alterada na década seguinte para ‘Glioblastoma multiforme’. Desde então, o termo passou a ser utilizado na literatura do campo por diferentes grupos de pesquisa para designar esta patologia, sendo atualmente empregado de maneira unânime da clínica à academia no universo da oncologia (SCHERER, 1940; BAILEY; CUSHING, 1926)

A partir destas caracterizações pioneiras, a neuro-oncologia avançou para critérios diagnósticos progressivamente mais precisos e padronizados. Até a última década, o diagnóstico de GBM se baseava exclusivamente em critérios histopatológicos definidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em sua classificação de 2007, exigindo a demonstração de hipercelularidade com astrócitos atípicos, mitoses frequentes, proliferação microvascular e/ou necrose (LOUIS et al., 2016). No entanto, evidências acumuladas ao longo dos anos indicaram que

características moleculares, como a mutação no gene da isocitrato desidrogenase (*IDH*), estavam associadas a diferenças marcantes no prognóstico e na idade dos pacientes, sendo que os tumores com *IDH*-mutado, também denominados glioblastomas secundários, tendiam a ocorrer em indivíduos mais jovens e a apresentar evolução mais lenta (YANG et al., 2015). Em reconhecimento a essas descobertas, a revisão da classificação da OMS em 2016 passou a incluir a determinação do status mutacional do *IDH*, dividindo os GBM em *IDH*-selvagem e *IDH*-mutado (LOUIS et al., 2016). Mais recentemente, a versão de 2021 reservou o termo glioblastoma (sem o adjetivo multiforme) exclusivamente para tumores *IDH*-selvagem e reclassificou os anteriormente denominados glioblastomas *IDH*-mutados como astrocitomas, incorporando ainda outros marcadores moleculares relevantes, como a mutação no promotor da *TERT*, amplificação do *EGFR* e alterações cromossômicas envolvendo perdas no cromossomo 10 e ganhos no cromossomo 7 (LOUIS et al., 2021; BRAT et al., 2020).

Atualmente, a OMS classifica os tumores do SNC de acordo com o tipo celular em que se originam e os tumores em geral em quatro categorias de acordo com a agressividade que vão de I a IV do menos agressivo ao mais agressivo, sendo: I – tumores benignos, pouco agressivos e com baixa probabilidade de invadirem outros tecidos; II – tumores de crescimento lento, mas com potencial de se tornarem mais agressivos com o tempo e invadirem outros tecidos; III – tumores malignos com maior risco de invadirem outros tecidos e com maior chance de persistência após o tratamento padrão e IV – tumores malignos com o maior grau de agressividade, que necessariamente invadem outros tecidos e tendem a persistir após o tratamento (LOUIS et al., 2021).

GBM é um tumor maligno primário da glia (glioma) originado a partir da diferenciação de astrócitos (Fig.1). O GBM é enquadrado na categoria IV na escala de agressividade da OMS, sendo o mais agressivo dos tumores do SNC. Além disso, o GBM é também o tipo mais frequente dos tumores do SNC: com uma incidência de cerca de 8.200 novos diagnósticos por ano no Brasil, os casos de GBM representam 80% dos tumores malignos primários do SNC, apresentando 27% a mais de prevalência em indivíduos do sexo masculino (INCA, 2015; INCA, 2019; SOUZA et al., 2023; MARINOWIC et al., 2024a). As taxas de ocorrência de GBM apresentaram um aumento marginal nas últimas duas décadas. Esse fenômeno está associado a avanços sistemáticos na oncologia, tanto em âmbito nacional quanto global, como a ampliação do acesso a centros de saúde, o advento e a popularização dos exames radiológicos e a melhoria dos registros populacionais de câncer. Além disso, fatores como o envelhecimento

populacional e a maior exposição a agentes carcinogênicos ambientais também podem contribuir para esse cenário. (FISHER et al., 2007).

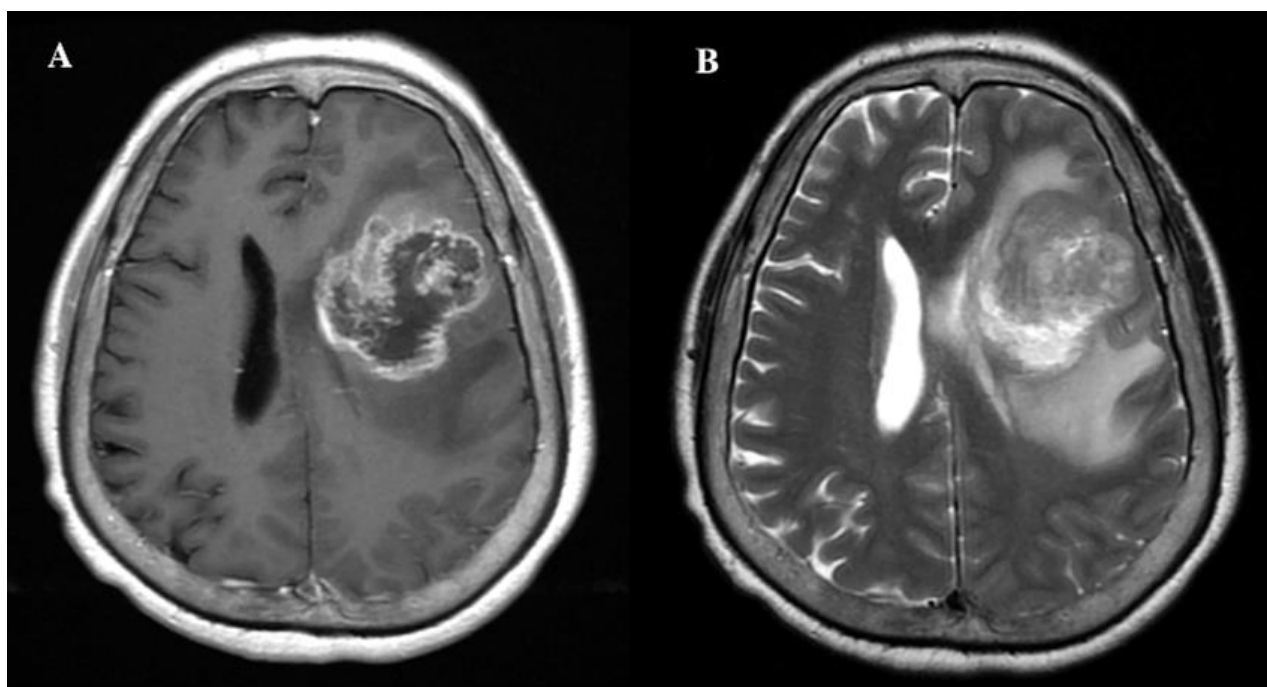


Figura 1. Ressonância magnética de imagem (RMI) do cérebro de paciente apresentando GBM. RMI associado a: (A) Contraste axial ponderado em T1, mostrando uma massa tumoral com realce da borda e necrose central hipointensa sem realce no lobo frontal esquerdo. (B) Contraste axial ponderado em T2, mostrando um edema peritumoral extensivo associado a lesão da massa encefálica. Adaptado de Ko et al, 2016 (KO et al., 2016)

Na maioria dos casos o GBM se manifesta em indivíduos adultos de idade avançada, de acordo com Wen & Kesari (2008). A média de idade no momento do diagnóstico é de $64 \pm 12,4$ anos. Tipicamente, os pacientes dirigem-se aos centros de saúde de atenção primária com um quadro clínico que envolve uma variedade de sintomas que vão desde dores de cabeça a confusão mental, perda de memória, convulsões, perda de movimento, sensação ou função de locais específicos do corpo a depender da região de desenvolvimento do tumor. (WEN; KESARI, 2008). A variedade de sintomas presentes também em uma gama de outras neuropatias pode facilmente levar a interpretações errôneas a respeito do quadro do paciente, o que faz com que em geral o indivíduo retorne aos centros de saúde várias vezes até o diagnóstico correto. A principal ferramenta não-invasiva usada para diagnosticar esta patologia consiste no exame de ressonância magnética de imagem com o auxílio de diferentes técnicas de contraste e perfusão associadas (MCKINNON et al., 2021). Usualmente, os quadros clínicos de GBM são divididos em dois subtipos tendo como base a patogênese associada: GBM

primário, que corresponde a 95% dos casos, emerge *de novo* e desenvolve-se até a apresentação de sintomas em um período máximo de 6 meses, e GBM secundário, que emerge a partir de astrocitomas de baixa agressividade em um período de até 15 anos até a apresentação de sintomas que tornam possível a sua caracterização. Apesar destas diferenças, a progressão do quadro clínico, o conjunto de abordagens terapêuticas e a resposta a estas intervenções são muito similares em ambos os subtipos de GBM (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015).

Até o presente momento, o tratamento do GBM consiste na remoção cirúrgica do máximo possível da massa tumoral, seguida de uma combinação de sessões de quimio e radioterapia designada para conter a disseminação do tumor. A base da quimioterapia para GBM, conforme os protocolos padrão atuais, é a temozolomida, um agente alquilante oral, geralmente em combinação com outros fármacos como a carmustina ou a lomustina (ALIFIERIS; TRAFALIS, 2015). Diferentemente de outros carcinomas, a remoção completa do GBM não é possível, uma vez que este tumor se infiltra profundamente no tecido cerebral que o reveste, sendo indistinguível do mesmo. Esta limitação é o motivo do GBM recidivar na imensa maioria dos pacientes nos 7 primeiros meses pós-diagnóstico e do risco de recorrência permanecer alto durante todo o restante do tratamento (STUPP et al, 2009). A agressividade, rápida progressão e recorrência do GBM fazem com que o intervalo médio de sobrevida dos pacientes seja de 12 a 15 meses após o diagnóstico, com apenas 3,3% dos indivíduos atingindo a marca de 2 anos (WEN et al., 2006). Assim, o tratamento do GBM busca acima de tudo aliviar os sintomas que surgem em decorrência da inevitável progressão do tumor, tais como: edema cerebral, disfunção cognitiva, fadiga e depressão. Uma vez que estes sintomas se apresentam de maneira variável, faz-se necessária uma abordagem terapêutica personalizada e multidisciplinar, que além de tudo deve avaliar fatores como o estágio do câncer no momento do diagnóstico, a velocidade da progressão do quadro e a idade do paciente (WEN et al., 2006).

Tendo em vista o aumento da eficácia no diagnóstico com o objetivo de proporcionar um tratamento direcionado, os estudos abordando a patogênese de tumores a nível celular e molecular são de fundamental importância. No caso do GBM, a expressão diferencial de marcadores moleculares encontrados na biópsia permite classificar os tumores entre o subtipo primário e secundário: em geral, GBMs primários apresentam super-expressão de uma versão mutante do receptor do fator de crescimento epidérmico (*EGFRvIII*); GBMs secundários, por outro lado, apresentam aumento da sinalização celular habilitado pela super-expressão do receptor *PDGF-A* (KLEIHUES; OHGAKI, 1999). O fato de fatores de crescimento fazerem parte da assinatura molecular tanto de tumores primários como de tumores secundários não

surpreende: a alteração na regulação de genes com este tipo de função é um componente presente em diferentes tipos de carcinoma que muito provavelmente está envolvido no processo de tumorigênese do GBM (MUPPALA, 2021; VLASOVA-ST. LOUIS; BOHJANEN, 2017)

Para além dos fins diagnósticos, a compreensão dos mecanismos moleculares por trás do crescimento tumoral dá base às linhas de pesquisa aplicada que visam desenvolver terapias capazes de desacelerar ou mesmo inibir este crescimento. Neste sentido, as imunoterapias que têm como alvo proteínas receptoras são uma grande promessa dentro da oncologia (ZHANG; ZHANG, 2020). A exemplo do potencial latente deste tipo de tecnologia para o tratamento de tumores desafiadores, destaca-se o trabalho de Foehr e colaboradores, (2006) que a partir do bloqueio imunológico do domínio extracelular da proteína *PTPRZI* conseguiu atrasar o crescimento da massa tumoral do GBM. O artigo conclui com o apontamento deste gene como um alvo ideal para futuros estudos em imunoterapia de GBM devido à sua expressão seletiva e relevância funcional (FOEHR et al., 2006). A proteína receptora da tirosina-fosfatase tipo Z1 (*PTPRZI*) é um receptor transmembranar, apresentando um domínio extracelular que interage com moléculas exógenas diversas e um domínio intracelular que atua como uma armação, aglutinando pelo menos nove proteínas no citoplasma, o que teoricamente afunila a propagação de sinais de crescimento celular em resposta ao meio (BOURGONJE et al., 2014). O gene que codifica a *PTPRZI* localiza-se no cromossomo 7, e corroborando o que foi encontrado para glioblastomas, sua expressão tem sido associada com a progressão de alguns tipos de tumores, como o câncer de pulmão de células pequenas (MAKINOSHIMA ET AL., 2012).

No contexto das terapias direcionais, destaca-se ainda uma abordagem distinta da já discutida: a linha de pesquisa com vírus oncolíticos, que vem ganhando crescente relevância na oncologia. Se a imunoterapia visa “cercar as fronteiras” do câncer, a proposta dos vírus oncolíticos é ainda mais ousada: cruzar estas fronteiras, destruindo o inimigo de dentro para fora.

1.2. Vírus Oncolíticos

O primeiro trabalho demonstrando experimentalmente a interferência de uma infecção viral no crescimento de um tumor data de 100 anos (LEVADITI; NICOLAU, 1923). É bem provável que a inspiração para tal pesquisa tenha emergido após uma série de relatos de caso anteriores retratando algum grau de remissão tumoral em pacientes que experienciaram quadros clínicos

correspondentes a infecções virais conhecidas à época (DOCK, 1904). Esta referência figura no trabalho da Dra. Alice Moore (1949), que desenhou uma estrutura experimental com o objetivo de investigar o fenômeno da oncólise viral cerca de duas décadas após esta descoberta. Trabalhando com isolados virais da encefalite do carrapato, Influenza A e Herpes Simplex, a médica infectou camundongos transplantados com a linhagem tumoral Sarcoma 180, o que rendeu dois trabalhos demonstrando o efeito destrutivo destas infecções nos tumores e o impacto disto na sobrevivência dos modelos estudados (MOORE, 1949a, 1949b).

A alta qualidade do detalhamento presente nos trabalhos de Moore favoreceu a replicabilidade dos experimentos. Isto somado à expectativa enorme gerada pelos resultados, tendo em vista o desaparecimento completo dos tumores em alguns modelos, deu início a uma verdadeira corrida em busca do vírus ideal para diferentes tipos de formação tumoral: dezenas de linhagens virais como Bunyamwera, Ilheus, Dengue (DENV), Febre amarela (YFV), Vírus do Oeste do Nilo (WNV), Semliki forest vírus, sarampo, varíola, diversos tipos de adenovírus, dentre outras tantas cepas foram selecionadas para este tipo de pesquisa (KELLY; RUSSEL, 2007). Contudo, para o desapontamento dos grupos de pesquisa oncológica à época o tamanho destes efeitos mostrou-se muito maior em camundongos do que em pacientes, o que colocou em xeque a relevância do modelo de animais com transplantes tumorais (BMJ, 1957).

A fim de expandir o modelo em busca de validá-lo, Southam e Moore (1957), passaram a transplantar linhagens tumorais em seres humanos voluntários e sequencialmente infectá-los com vírus oncolíticos. Em alguns casos não houve regressão tumoral e o tumor teve que ser excisado mais de uma vez, devido à recorrência (SOUTHAM et al, 1957). O estudo recebeu duras críticas dos pares à época e serviu para criar um forte estigma em torno da pesquisa com vírus oncolíticos, o que fez com que o campo de estudo ficasse travado por mais de meio século. Em grande parte, o temor se manteve devido ao nosso limitado conhecimento sobre os mecanismos moleculares das interações entre vírus e tumor, e dos possíveis efeitos adversos nos indivíduos submetidos a um eventual tratamento. O enorme avanço em virologia das duas últimas décadas, propiciado especialmente pelo advento das ciências ômicas, permitiu que parte destes mecanismos começassem a ser elucidados, reacendendo o debate em torno dessa poderosa ferramenta. Com isso, a despeito de possuir mais de um século de história a pesquisa dos vírus oncolíticos é um campo ainda hoje incipiente, atraindo merecida atenção da comunidade científica: de virologistas à centros de oncologia em todo o planeta (KELLY; RUSSELL, 2007).

Antes de discutir os mecanismos moleculares do efeito de infecções virais em tumores, faz-se necessária uma definição: Vírus oncolíticos são vírus - naturais ou geneticamente modificados

- com capacidade comprovada de replicar-se seletivamente nas células cancerígenas, destruindo-as causando pouco ou nenhum dano às células saudáveis do organismo. Apesar destes vírus serem capazes de infectar outros tipos de células, a taxa de replicação dos mesmos é notavelmente maior em tumores. A apoptose nestes tecidos ocorre devido a dois processos interligados: lise celular, que decorre da instabilidade da membrana causada pelo brotamento de um enorme número de partículas virais após a infecção e a indução de imunidade antitumoral, que surge pelo reconhecimento imunológico de antígenos associados a tumor liberados durante o primeiro processo (KAUFMAN; et al, 2015). Portanto, a alta taxa de replicação dos vírus oncolíticos em células tumorais é, em si, uma das responsáveis pelo efeito oncolítico.

A causa dessa taxa aumentada, no entanto, não se deve exclusivamente a fatores virais. As anomalias inerentes às células cancerosas, resultantes do acúmulo de mutações em genes envolvidos nas vias de detecção e resposta a infecções virais, no controle do estresse celular e na manutenção da homeostase, comprometem a capacidade dessas células de montar respostas antivirais efetivas. Esse enfraquecimento dos mecanismos de defesa, frequentemente associado a uma elevada instabilidade genômica, torna o ambiente tumoral mais permissivo à replicação viral. Além disso, a superexpressão recorrente de determinados fatores de transcrição celulares, observada em diversas neoplasias, contribui para criar um perfil transcricional que favorece tanto a entrada quanto a multiplicação do vírus, ao modular a expressão de receptores, vias metabólicas, tradução e fatores utilizados durante as diferentes etapas do ciclo viral, criando um ambiente favorável à replicação. Essa combinação de vulnerabilidades, isto é, a diminuição das defesas antivirais e ativação constitutiva de vias celulares utilizadas pelo vírus, estabelece um terreno fértil para a infecção seletiva. Dessa forma, o efeito oncolítico pode ser interpretado não apenas como uma propriedade intrínseca do vírus, mas como um fenômeno sistêmico que emerge da interação entre as características do vírus e as alterações moleculares presentes nas células tumorais durante uma infecção. Essa complexa comunicação vírus-célula tumoral que culmina na morte seletiva das células neoplásicas, demonstra como este efeito é um evento multifatorial e contextualmente dependente. (HANAHA; WEINBERG, 2011).

O gatilho que dispara essa cascata de eventos é o reconhecimento das glicoproteínas da partícula viral pelo domínio extracelular das proteínas receptoras da membrana da célula. A especificidade desta ligação é o que determina o tropismo da infecção e consequentemente a seletividade do dano, sendo um dos atributos necessários para categorizar um vírus como oncolítico e quantificar este efeito. Assim, quanto mais seletiva a penetração de um vírus nas células tumorais em comparação com as células saudáveis de um organismo, maior o efeito

oncolítico deste vírus neste tumor (HALLENBECK et al., 2005). O papel da interação glicoproteína viral-receptor celular não se limita à entrada e a internalização da partícula viral, podendo ativar vias de sinalização que atuam na célula em questão e em células vizinhas (CAMPBELL; GROMEIER, 2005). A nível celular, a variabilidade na expressão dos genes codificadores de proteínas receptoras de membranas leva a um número quase inestimável de combinações possíveis de receptores para cada tipo de tecido saudável. Esta complexidade é ainda maior em se tratando de células tumorais, que podem apresentar mutações em genes associados a este processo, tais como caderinas e integrinas. O conjunto de receptores comumente encontrados em proporções típicas em cada tipo celular é o que determina o tropismo viral, que é o direcionamento de um vírus para um tecido específico. Este atributo faz com que a busca por novos candidatos a vírus oncolíticos leve em conta a compatibilidade prevista entre as glicoproteínas das partículas virais e os receptores expressos nas diferentes linhagens tumorais. Finalmente, isto direciona as pesquisas com vírus cujo efeito oncolítico foi demonstrado, dando início a uma busca pelo principal receptor que participa desta interação nas linhagens tumorais associadas. A exemplo disto temos o trabalho de Kuryk & Møller (2020), que estabeleceu a proteína *DSG2* como sendo o receptor para a entrada da quimera viral Ad5/3 (adenovírus) desenvolvida como terapia oncolítica para o câncer de ovários (BARTON et al., 2001; MONTGOMERY et al., 1996; TOMKO et al., 1997; KURYK; MØLLER, 2020).

Diferentemente do que ocorre em tecidos saudáveis, uma vez dentro da célula tumoral o vírus não é facilmente detectado pelas vias de sinalização da imunidade inata. Uma revisão do assunto feita por Kaufman e colaboradores, (2015), apontou que genes como *RIG-I*, *IRF7*, e *IRF3*, envolvidos no reconhecimento do RNA viral e ativadores da cascata de sinalização para a expressão de interferons, costumam ser silenciados nessas células. Ao mesmo tempo, mutações deletérias em genes da via de interferon tipo-1 (*IFN-I*) fazem com que a apoptose seja limitada, permitindo que a replicação viral ocorra. Com o brotamento massivo de partículas virais que ocorre em seguida, no entanto, a lise celular se torna inevitável. O rompimento das células tumorais libera um conjunto de sinais moleculares, que vão desde antígenos tumorais a padrões moleculares associados a patógeno e a dano que incluem: proteínas de choque térmico, proteínas do tipo HMGB1, calreticulinas, e uma classe inteira de citocinas que promovem a maturação das células apresentadoras de antígeno, que então ativam as células TCD4⁺ e TCD8⁺ locais, recrutando toda uma resposta inflamatória para o ambiente tumoral. Toda essa ativação recruta uma classe de células efectoras de citotoxicidade do sistema

imune capazes de migrar de tecidos distantes do corpo através da circulação sanguínea em direção ao tumor.

Por fim, é preciso complementar os mecanismos apresentados com a seguinte ponderação: o recrutamento do sistema imune produz um efeito antagônico na ação terapêutica dos vírus oncolíticos, visto que a oncólise não libera apenas antígenos tumorais, mas também proteínas virais, como supracitado. Ao serem apresentados às células T, estes padrões de patogenicidade fazem com que o sistema imune procure combater a infecção viral pelas mesmas vias que promove o combate ao tumor. Assim, o desenvolvimento de terapias antitumorais com vírus oncolíticos deve considerar o tamanho do efeito por dose tendo em mente o equilíbrio entre o aumento pretendido e a diminuição inevitável da eficácia do tratamento com o progresso da infecção. Isto se reflete na escolha do modelo viral a ser utilizado, que pode priorizar vírus naturalmente pouco imunogênicos ou modificados para expressar menos antígenos, retardando a detecção pelo sistema imune inato, além da padronização de doses e cronogramas de administração terapêutica. (KAUFMAN et al, 2015).

O conjunto de mecanismos sucintamente apresentado neste tópico consiste em uma construção coletiva de diversos grupos de pesquisa, sendo potencializada pela heterogeneidade dos objetos de estudo dentro do campo. Cada novo vírus sobre o qual a hipótese de efeito oncolítico é levantada e cada linhagem tumoral teoricamente susceptível a este efeito constitui um modelo para que novos mecanismos, receptores e vias moleculares sejam elucidados. Tamanho esforço fez com que o estigma de meio século associado ao emprego de vírus oncolíticos de maneira terapêutica fosse enfim superado. Até o presente momento, cinco terapias baseadas em vírus oncolíticos foram aprovadas para o tratamento de diferentes tipos de tumores (SHALHOUT et al., 2023). Para além destas, temos o registro de 88 protocolos de ensaio clínico - fases I a III - baseados em 10 linhagens virais distintas de acordo com a última revisão sistemática do campo. Destas, 27 são aplicáveis ao contexto do GBM (Tabela 1; COOK & CHAUHAN, 2020).

Tabela 1. Protocolos de ensaio clínico de viroterapias oncolíticas aplicáveis em GBM. Ensaios clínicos (Fases I–III) envolvendo vírus oncolíticos (VO) aplicados especificamente a glioblastoma multiforme (GBM) ou a “tumores sólidos em geral”. A tabela apresenta a descrição de cada ensaio, a fase clínica correspondente, o número de participantes incluídos (n), o modelo viral utilizado e o tipo de câncer investigado. Adaptado de Cook & Chahuan, 2020 (COOK & CHAUHAN, 2020).

Descrição do ensaio clínico	Fase	n	Modelo viral	Câncer
Ensaio de fase I de HSV-1 oncolítico (G207), administrado em combinação com radioterapia para GBM recorrente, demonstrando segurança e respostas radiográfica.	I	9	G207 (HSV-1)	GBM
Ensaio clínico de fase I com administração intravenosa de PV701, um vírus oncolítico, em pacientes com tumores sólidos avançados.	I	79	PV701 (Newcastle virus)	Cânceres sólidos avançados
Estudo clínico de fase I da administração intravenosa de PV701 usando um regime de dessensibilização em duas etapas.	I	16	PV701 (Newcastle virus)	Tumores sólidos avançados
Regime clínico otimizado para o vírus oncolítico PV701.	I	18	PV701 (Newcastle virus)	Cânceres avançados
Fase I de ciclofosfamida como modulador imune para otimizar a entrega de reovírus oncolítico a tumores sólidos.	I	36	RT3D (Reovirus Type 3 Dearing)	Tumores sólidos avançados
Estudo de fase I da combinação de reovírus tipo 3 Dearing intravenoso e gemcitabina em pacientes com câncer avançado.	I	16	RT3D (Reovirus Type 3 Dearing)	Cânceres sólidos avançados
Ensaio de fase I de administração intravenosa de reovírus tipo 3 Dearing em pacientes com câncer avançado.	I	36	RT3D (Reovirus Type 3 Dearing)	Cânceres avançados
Ensaio de fase I de administração intratumoral de reovírus em pacientes com gliomas malignos recorrentes.	I	12	Reolysin	Gliomas malignos recorrentes
Estudo de fase I em duas etapas (escalonamento de dose) de reovírus tipo 3 Dearing intratumoral combinado com radioterapia paliativa em pacientes com câncer avançado.	I	23	Reolysin	Cânceres sólidos avançados com indicação de radioterapia paliativa
REO-10: estudo de fase I de reovírus intravenoso combinado com docetaxel em pacientes com câncer avançado.	I	16	Reolysin	Cânceres sólidos avançados
REO-001: ensaio de fase I de administração intralesional percutânea de reovírus tipo 3 Dearing (Reolysin®) em tumores sólidos avançados.	I	19	Reolysin	Tumores sólidos avançados
Ensaio clínico de fase I de infusão intratumoral de reovírus para tratamento de gliomas malignos recorrentes em adultos.	I	15	Reolysin	Glioma maligno
Glioblastoma recorrente tratado com poliovírus recombinante.	I	61	PVSRIP0 (Polio Virus)	Glioblastoma
Efeitos imunológicos de ciclofosfamida em baixa dose em pacientes com câncer tratados com adenovírus oncolítico.	I	21	Ad5/3-(delta)24	Tumores sólidos avançados resistentes à quimioterapia
Adenovírus oncolíticos alvo-integrina Ad5-D24-RGD e Ad5-RGD-D24-GMCSF para tratamento de tumores sólidos refratários à quimioterapia.	I	16	Ad5-D24-RGD and Ad5-RGD-D24-GMCSF	Tumores sólidos avançados resistentes à quimioterapia
Imunidade antiviral e antitumoral de células T em pacientes tratados com adenovírus oncolítico codificando GM-CSF.	I	60	CGTG-102 (Ad5/3-delta24-GMCSF)	Tumores sólidos avançados
Dados imunológicos de pacientes tratados com Ad5/3-E2F-Δ24-GMCSF sugerem utilidade para imunoterapia tumoral.	I	13	CGTG-602 (Ad5/3-E2F-delta24-GMCSF)	Tumores sólidos avançados
Adenovírus oncolítico ICOVIR-7 em pacientes com tumores sólidos avançados e refratários.	I	21	ICOVIR-7 (adenovirus)	Tumores sólidos avançados

Ensaio de fase I de adenovírus oncolítico recombinante superexpressando HSP70 em tumores sólidos avançados.	I	27	Telomelysin/OBP-301 (adenovírus com telomerase e transcriptase reversa humanas, hTERT)	Tumores sólidos avançados
Descrição do ensaio clínico	Fase	n	Modelo viral	Câncer
Ensaio de fase I, aberto, com escalonamento de dose e realizado em múltiplas instituições, envolvendo a injeção do adenovírus atenuado no gene E1B, ONYX-015, na região peritumoral de gliomas malignos recorrentes, no contexto adjuvante.	I	24	ONYX-015	Glioma maligno
Ensaio de fase I de ONYX-015 intravenoso combinado com Enbrel em tumores sólidos.	I	9	ONYX-015	Cânceres avançados
Ensaio de fase I de adenovírus oncolítico replicativo específico para telomerase (telomelysin) para tumores sólidos.	I	27	H103 (Adenovírus expressando HSP70)	Tumores sólidos avançados
Primeiro estudo em humanos do vaccínia oncolítico cepa Western Reserve: segurança, disseminação sistêmica e atividade antitumoral.	I	16	vvDD (Poxvírus – cepa Western Reserve do vírus vaccínia oncolítico)	Tumores sólidos avançados
O parvovírus H-1 oncolítico demonstra segurança e imunogenicidade em estudo de fase I/IIa em glioblastoma.	I/II	18	Parvovirus	Glioblastoma
Fase I/II de NDV-HUJ oncolítico intravenoso em glioblastoma recorrente.	I/II	14	NDV-HUJ (cepa HUJ do Newcastle disease virus)	Glioblastoma
Estudo multicêntrico de fase II de imunoterapia citotóxica mediada por gene como adjuvante à ressecção cirúrgica para glioma maligno recém-diagnosticado.	II	48	AdV-tk (aka aglatimagene besadenovec ou ProstAtak)	Glioma
Estudo clínico de fase II da administração intratumoral do adenovírus oncolítico H101, deletado em E1B, em combinação com quimioterapia em pacientes com câncer.	II	50	H101 (adenovirus com deleção do E1B)	Tumores malignos

Conforme discutido, apesar de possuir mais de um século de história, a pesquisa com vírus oncolíticos ainda constitui uma linha de estudos incipiente. Sendo assim, as linhagens virais apresentadas sumariamente neste tópico estão longe de contemplar todo o panorama dos vírus oncolíticos e mesmo de responder todas as questões que tangenciam os mecanismos moleculares que participam deste processo. Se estendêssemos nossa discussão visando incluir vírus cujo efeito oncolítico foi demonstrado, mas que por razões diversas não foram submetidos a ensaios clínicos, esbarraríamos em algumas dezenas de trabalhos a respeito dos quais o aprofundamento extrapolaria o escopo desta tese. Em muitos casos, os fatores que fazem com que algumas linhagens virais estejam mais “atrasadas” que outras na corrida do desenvolvimento de terapias oncológicas estão relacionados fortemente com a época em que o vírus passa a ser estudado. É o caso do Zika Vírus (ZIKV), que ganhou a atenção da comunidade científica após ao surto que introduziu este patógeno na América Latina, associado ao aumento do número de casos de microcefalia no Brasil em 2015 (ECDC, 2015). Nos últimos

anos, este vírus vem sendo cada vez mais estudado por grupos que pesquisam o fenômeno do efeito oncolítico desde que Zhu e colaboradores, trabalhando com modelos *in vitro* e *in vivo*, demonstraram uma expressiva indução à apoptose em uma linhagem celular de GBM ao ser submetida à infecção com ZIKV (ZHU et al., 2017). Desde então, o esforço em replicar e elucidar este efeito produziu uma série de trabalhos que serão apresentados posteriormente. Antes disso, entretanto, a caracterização dos aspectos genômicos, clínicos e epidemiológicos do ZIKV faz-se necessária a fim de fundamentar a discussão em torno dos resultados que tem instigado pesquisadores do campo na luta contra o câncer mais agressivo do SNC.

1.3. Zika vírus (ZIKV)

O Zika vírus é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes sp.*, integrando um grupo parafilético de vírus de importância médica e veterinária (arbovírus). Sendo transmitidos por vetores artrópodes hematófagos, apresentam comumente reservatório(s) e hospedeiro intermediário(s) e definitivo(s) em seu ciclo replicativo (WEAVER; REISEN, 2010). Isolado pela primeira vez em Uganda em 1947, o ZIKV foi posteriormente incluído no gênero *Flavivirus* (família Flaviviridae) juntamente com outras linhagens virais conhecidas por infectar seres humanos como DENV, YFV e WNV, das quais é proximamente relacionado (Fig. 2) (DICK; KITCHEN, 1952).

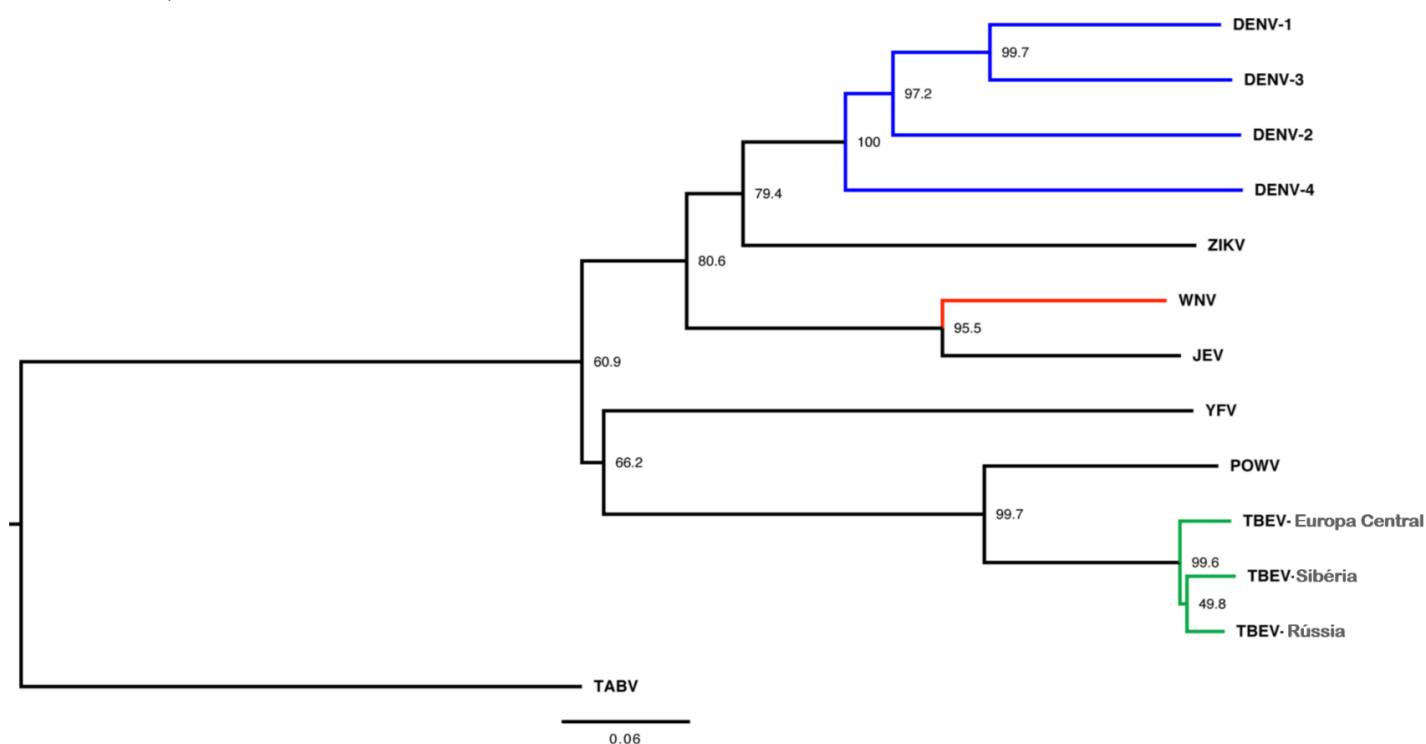


Figura 2. Reconstrução filogenética dos flavivírus de importância médica. Árvore filogenética do construída a partir do alinhamento do gene do envelope (E) dos membros do gênero *Flavivirus* incluindo os quatro sorotipos do vírus da Dengue (DENV-1 a DENV-4), ZIKV, WNV, Vírus da Encefalite Japonesa, YFV, Vírus de Powassan, vírus da encefalite do carrapato e *Tamara bat virus*. O valor dentro do nó apresenta o número percentual consensos para o mesmo após bootstrap de 1000x. A barra de escala representa uma mudança de 6% na identidade da sequência de aminoácidos. Adaptado de Duehr et al, 2018 (DUEHR et al., 2018).

A partícula viral de ZIKV tem aproximadamente 50-100 nm de diâmetro e, como os demais flavivírus, se assemelha exteriormente a uma bola de golfe devido à organização estrutural das proteínas do envelope dos vírus incluídos neste gênero, que é composto por 180 cópias de uma díade de proteínas: envelope e membrana que se dispõem de maneira integrada, com a proteína E voltada para o exterior da partícula. (Fig. 3). Assim como ocorre em outras linhagens do gênero, a proteína E de ZIKV consiste em 4 domínios, sendo 1 domínio transmembranar e 3 domínios extra-membranares, denominados ectodomínios I, II e III. Nas partículas infecciosas (maduras), as proteínas M/E organizam-se em dímeros, que por sua vez aparecem associados paralelamente de 3 em 3, em uma configuração apelidada de jangada. Portanto, o vírion dos flavivírus - incluindo o ZIKV - é um poliedro que surge do arranjo de 30 “jangadas” (SIROHI; KUHN, 2017).

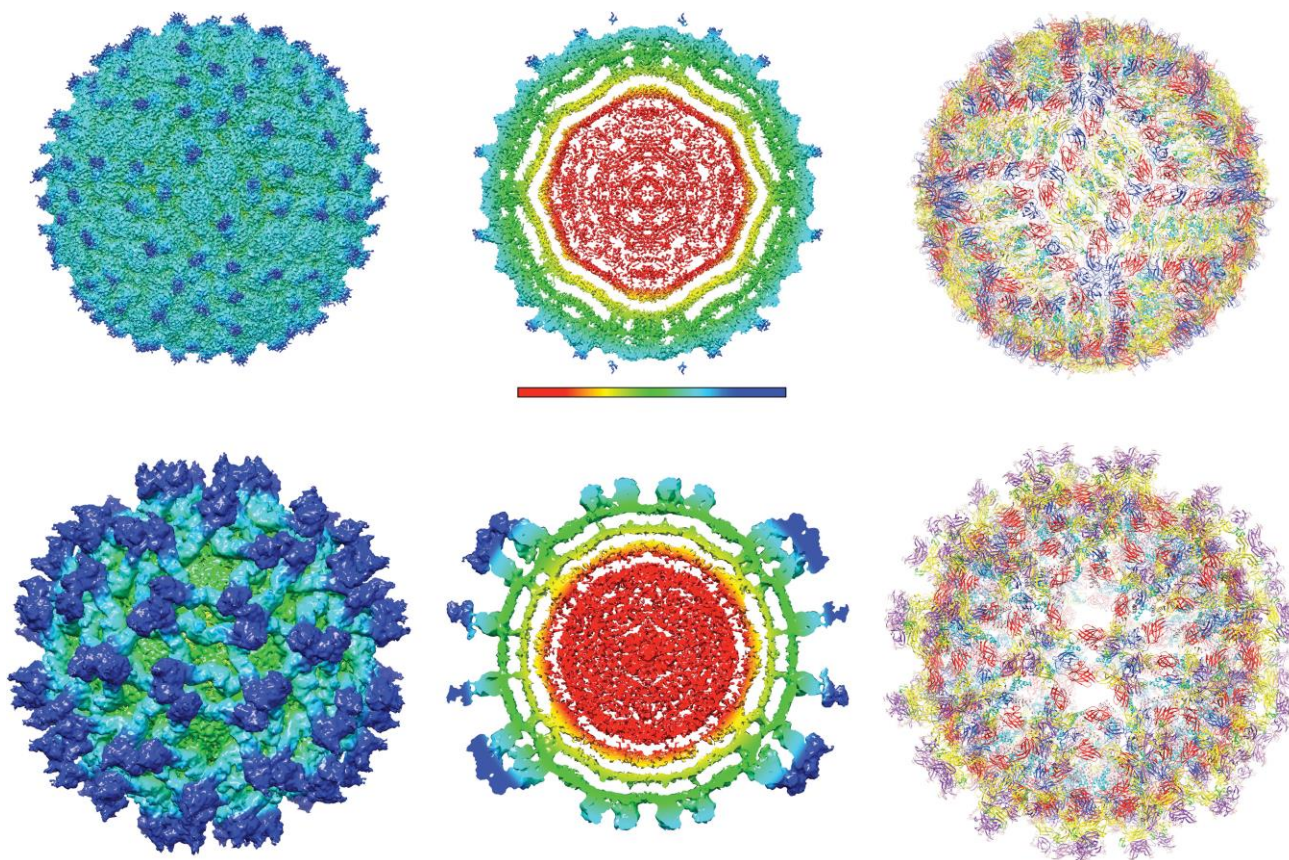


Figura 3. Estrutura da partícula do ZIKV. Estrutura da partícula viral (vírion) de Zika, mostrando diferentes arranjos da forma madura infecciosa (linha superior) e da forma imatura (linha inferior) do vírus. Adaptado de Sirohi & Kuhn, 2017 (SIROHI; KUHN, 2017).

Sendo a estrutura da partícula um atributo bastante conservado evolutivamente dentro do grupo, a arquitetura viral do ZIKV é quase idêntica à de outros flavivírus, o que faz com que as diferenças possam ser observadas apenas a nível atômico. A exemplo disto, quando a partícula de DENV-2 e a de ZIKV são sobrepostas, a diferença média entre as distâncias das posições atômicas é de apenas 1,8 Å. Este valor ínfimo é surpreendente, tendo em vista que a identidade genômica entre estas duas linhagens é de apenas 54%. Neste caso, a maior variabilidade estrutural é encontrada no sítio de glicosilação, dentro do *loop* glicano, localizado próximo ao loop de fusão entre os dímeros de proteína E. Este domínio liga-se aos receptores de lecitina na membrana celular. Portanto, essa variação pode estar relacionada à maneira com que estes vírus interagem com as células hospedeiras e consequentemente explicar parte do tropismo histológico de cada patógeno. Assim, a caracterização genômica dos domínios do envelope que interagem com os receptores do hospedeiro são o primeiro passo para a compreensão dos mecanismos moleculares que regem uma infecção por ZIKV (SIROHI et al., 2016; SIROHI; KUHN, 2017).

O genoma do ZIKV consiste em uma fita única de RNA de polaridade positiva, com cerca de 10.800 bases nucleotídicas que são traduzidas em uma única poliproteína. A ordem e função dos 10 genes é conservada em relação aos demais flavivírus, sendo: o gene do capsídeo, pré-membrana e envelope, que codificam as 3 proteínas estruturais, seguidos dos genes que codificam as 7 proteínas não-estruturais: *NS1*, *NS2A*, *NS2B*, *NS3*, *NS4A*, *NS4B*, e *NS5*, no sentido 5' - 3' da fita (Fig 4.) (NANDY et al., 2016). Os genes estruturais do ZIKV ocupam apenas 23% do genoma. A maior parte da fita é traduzida em proteínas não-estruturais, que desempenham uma série de papéis na replicação, controle da tradução e montagem da partícula viral (JAVED et al., 2018) (Tabela 1).

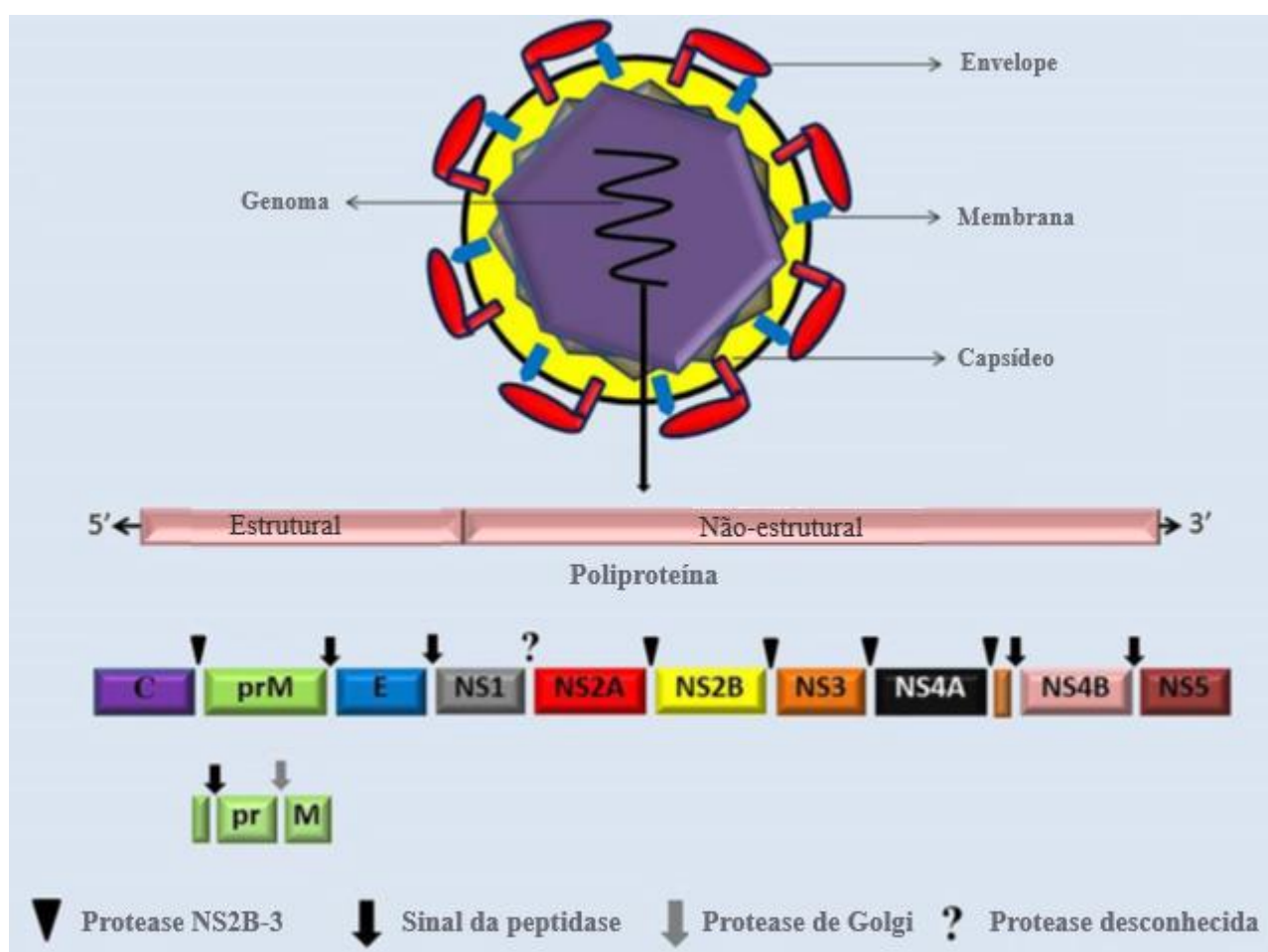


Figura 4. Desenho esquemático da estrutura do genoma do ZIKV. Estrutura genômica e caracterização funcional das proteínas do ZIKV. As cores dos genes estão correlacionadas com sua posição na partícula viral. Os locais indicados por triângulos são os sítios de clivagem acessados pela protease viral. As setas indicam os sítios clivados por proteases do hospedeiro e a interrogação um sítio de clivagem acessado por uma protease desconhecida. Adaptado de Javed *et al*, 2018 (JAVED et al., 2018).

Tabela 2. Genômica funcional do ZIKV. Nome, número de aminoácidos e função das diferentes proteínas codificadas pelo genoma do ZIKV. Adaptado de Javed *et al*, 2018 (JAVED *et al.*, 2018).

Gene (abreviação)	N. de aa	Função
Capsídeo (C)	122	Formação do nucleocapsídeo viral
Pré-membrana (prM)	178	Formação do capsídeo viral e adesão da proteína do envelope viral.
Envelope (E)	500	Ligação ao receptor hospedeiro, fusão e entrada
Proteína não-estrutural 1 (NS1)	384	Liberação, virulência e replicação viral
Proteína não-estrutural 2 (NS2A)	226	Transcrição e montagem viral
Proteína não-estrutural 2 (NS2B)	130	Cofator de NS3 para função de serina-protease, clivagem de poliproteína
Proteína não-estrutural 3 (NS3)	617	Desenrolamento do template da região da proteína estruturada e processamento da poliproteína viral via atividade de serina-protease, helicase e trifosfatase
Proteína não-estrutural 4 (NS4A)	127	Replicação viral
Proteína não-estrutural 4 (NS4B)	252	Organização do complexo de replicação viral

Proteína não-estrutural 5 (NS5)	902	Replicação de RNA via RNA polimerase dependente de RNA (RdRp) e capping do RNA
---------------------------------	-----	--

O primeiro genoma do ZIKV foi sequenciado em 2007, a partir de uma linhagem cultivada do isolado inicial de Uganda em 1947 (KUNO; CHANG, 2007). Durante décadas a dispersão do ZIKV se manteve regional, com o aparecimento de casos esporádicos que algumas vezes desencadeavam pequenos surtos na África e na Ásia, o que limitou o grau de interesse da comunidade científica pelo patógeno. Em 2007, um surto epidêmico grave vitimou Yap, uma das ilhas do arquipélago da Polinésia, infectando 75% da população em 4 meses. No período de 7 anos que seguiram este acontecimento, os surtos em países da Ásia como a Tailândia e Filipinas se tornaram frequentes, até culminar em outra epidemia preocupante na Polinésia Francesa em 2013. Logo em seguida, provavelmente em decorrência da copa do mundo de futebol em 2014 o ZIKV chegou ao Brasil, que fez o primeiro comunicado oficial de identificação do vírus em 2015. Finalmente, ao encontrar vetores aptos a dispersão, cujo ciclo vetorial é favorecido pelo clima tropical do país, o patógeno se estabelece, disseminando-se pela América do Sul em 2016 (JAVED et al., 2018). Atualmente, o ZIKV é classificado em 4 linhagens principais de acordo com a sua origem geográfica e diferenças genômicas: asiática, americana, leste e oeste da África (Fig. 5; ZADRA et al., 2024).

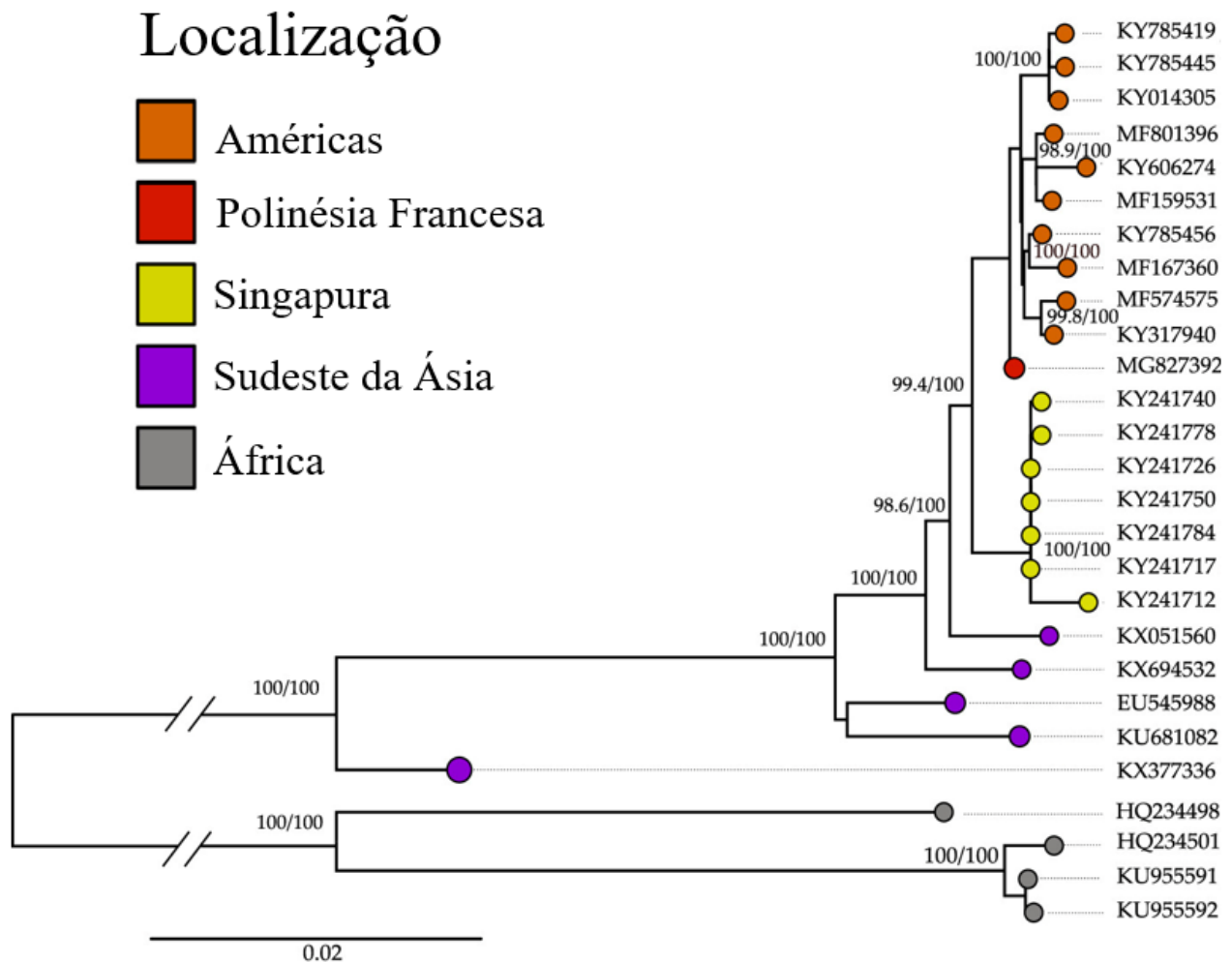


Figura 5. Filogenia das cepas do ZIKV com base em regiões recombinantes e não-recombinantes. Árvore de máxima verossimilhança da região não-recombinante gerada no IQ-tree utilizando um subconjunto de sequências de ZIKV. As extremidades estão coloridas de acordo com o local de coleta (Adaptado de ZADRA et al., 2024).

Percentualmente, as diferenças entre o genoma destas linhagens estão concentradas no gene do envelope, cuja proteína apresenta domínios que interagem diretamente com os receptores do hospedeiro, participando no reconhecimento da membrana celular e penetração viral nos diferentes tipos celulares (SHRIVASTAVA et al., 2018).

Vírus podem se utilizar de uma combinação de diferentes tipos de receptores situados na membrana a fim de penetrar nas células do hospedeiro. Em se tratando do ciclo replicativo do ZIKV, o trabalho de revisão realizado por Rombi e colaboradores, (2020) ajuda a esquematizar o cenário, organizando todos os processos envolvidos: Sabe-se que os receptores *AXL* e *TIM-*

I desempenham papéis cruciais na penetração do vírion, embora outros receptores já tenham sido descritos (NOWAKOWSKI et al., 2016).

A interação entre o vírion e a membrana da célula induz a endocitose da partícula viral. Assim que o endossomo é formado, inicia-se a acidificação do mesmo, que por sua vez promove mudanças conformacionais na proteína do envelope que terminam por promover a sua degradação, liberando a fita de RNA no citoplasma da célula. Possuindo polaridade positiva, o genoma de RNA do ZIKV é prontamente traduzido como uma poliproteína que é subsequentemente clivada por proteases virais e do hospedeiro em sítios específicos a medida em que simultaneamente é transportada para o retículo endoplasmático da célula. Estas modificações transformam a cadeia polipeptídica traduzida em um processo de maturação que culmina nas proteínas do ZIKV em suas sub-unidades protéicas funcionais.

Juntamente com outras proteínas não-estruturais, a proteína NS5, que exerce atividade de RNA-polimerase dependente de RNA e metil-transferase, promove a replicação e capeamento de um grande número de cópias do RNA do ZIKV. Ainda na superfície do RE, a proteína do capsídeo empacota o genoma de RNA de polaridade positiva juntamente com as outras proteínas estruturais necessárias durante o processo de montagem que termina em um vírion de ZIKV imaturo não-infeccioso. Em seguida, esta partícula imatura é transportada via complexo de Golgi para o exterior da célula via membrana plasmática enquanto passa concomitantemente pelo processo de maturação, que envolve a clivagem da proteína pre-membrana em peptídeo pr e proteína M, pela ação da protease Furina do hospedeiro, seguida por diversos processos de glicosilação das proteínas de envelope necessários à penetração das novas partículas virais formadas em novas células, completando o ciclo replicativo viral. Por fim, um número incontável de partículas maduras infecciosas é liberado para fora da célula por exocitose, dando continuidade ao ciclo (Fig. 5) em uma série de tecidos do hospedeiro até que os sintomas característicos do quadro clínico de uma infecção por ZIKV se manifestem (ROMBI et al., 2020).

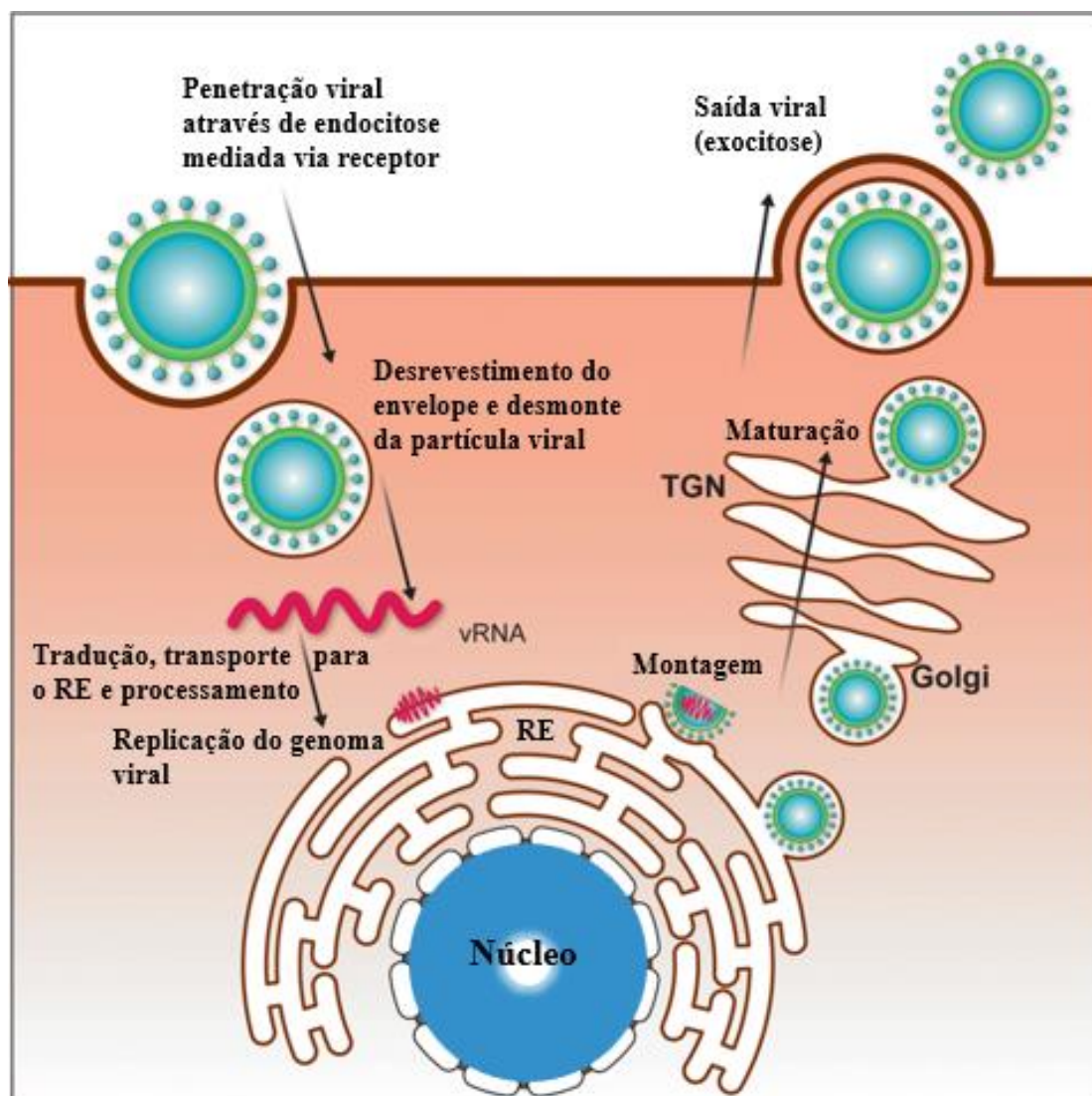


Figura 6. Esquema representativo do ciclo replicativo do ZIKV. Resumo dos principais eventos do ciclo replicativo do ZIKV representados como um fluxo de processos nos locais da célula onde acontecem. Adaptado de Rombi *et al*, 2020 (ROMBI et al., 2020).

Em indivíduos adultos, estima-se que aproximadamente 80% das infecções por ZIKV sejam assintomáticas. Quando presentes, o quadro clínico típico inclui febre, exantema maculopapular, conjuntivite, artralgia e mialgia, além de manifestações neurológicas como encefalite e mielite. Embora a Síndrome de Guillain-Barré seja um desfecho raro, sua ocorrência também tem sido consistentemente associada à infecção por ZIKV (SLAVOV et al., 2016). Em gestantes, contudo, a infecção pode ser transmitida verticalmente através da placenta em 0,3% a 15% dos casos, resultando na Síndrome Congênita do Zika, caracterizada principalmente por calcificações no SNC, lisencefalia, artrogrupos e microcefalia fetal, além

de, em cerca de 1% das ocorrências, levar a abortos espontâneos ou natimortos (DE OLIVEIRA MELO et al., 2016).

O ZIKV tem um tropismo preferencial para as células gliais e neuronais e em proliferação do feto, uma vez que as mesmas expressam o receptor *AXL* em uma quantidade muito superior às células neuronais já diferenciadas da mãe até o terceiro mês da gestação, período onde há o maior risco de transmissão placentária do vírus e desenvolvimento de caso de microcefalia (MOORE et al., 2017). Para entender melhor os mecanismos moleculares relacionados à interferência do ZIKV na formação do sistema nervoso central durante a embriogênese, um estudo de 2020 do nosso grupo de pesquisa realizou a integração entre o genoma, transcriptoma e proteoma de cérebros de 8 natimortos com infecção por ZIKV confirmada por RT-qPCR. O estudo encontrou 509 genes diferencialmente expressos em cérebros infectados com ZIKV em comparação com cérebros não-infectados. dados de transcriptoma, proteoma e exoma demonstram a modulação dos genes *PTPRZ1* e *COL1A* em cérebros de crianças infectadas com ZIKV, sendo o primeiro super-expresso e o segundo apresentando baixa expressão. Conforme discutido pelo artigo, o gene *COL1A* desempenha um papel estrutural na constituição da matriz de colágeno. Assim, a regulação destes dois genes atua promovendo o tropismo do vírus para as células do SNC do feto, em especial as células em proliferação (AGUIAR et al., 2020). Chama a atenção o fato de um dos genes induzidos em células da glia durante uma infecção por ZIKV ser o receptor *PTPRZ1*, uma vez que este gene também é um marcador de presença e severidade do GBM, com papel importante na comunicação celular, e consequentemente no crescimento deste tumor (AGUIAR et al., 2020; FOEHR et al., 2006; FUJIKAWA et al., 2017; NORMAN et al, 1998).

A migração e entrada preferencial do ZIKV em células neurais, especialmente as da glia, têm atraído considerável atenção da comunidade científica na última década, que aponta este tropismo como um atributo promissor para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas para gliomas. A investigação dos mecanismos por detrás do efeito oncolítico do ZIKV em células de GBM, incluindo a elucidação dos processos de penetração viral nas células tumorais, pode contribuir significativamente para o entendimento dos fenômenos biológicos envolvidos nessa interação e, consequentemente, para o delineamento de estratégias terapêuticas mais eficazes contra o GBM, conhecido por sua elevada resistência aos tratamentos convencionais. Habitualmente descritas como “o futuro da oncologia”, as terapias baseadas em vírus oncolíticos vêm se consolidando como alternativas promissoras no presente. A pesquisa com essas ferramentas oferece a perspectiva de melhorar a qualidade de vida dos

pacientes em relação às abordagens quimio- e radioterápicas tradicionais, devido ao menor risco de efeitos colaterais, dando uma perspectiva para pessoas que no momento se encontram escassas de alternativas.

Conforme discutido no tópico anterior, o estudo de Zhu e colaboradores (ZHU et al., 2017) inaugurou a investigação do efeito oncolítico do ZIKV em GBM. Desde então, nota-se um avanço no estudo deste efeito tanto por meio de trabalhos que pretendem decifrar os mecanismos moleculares envolvidos (KAO et al., 2023; XU et al., 2022; NAIR et al., 2021), como no desenvolvimento de oncoterapias virais baseadas em ZIKV (SU & BALASUBRAMANIAM, 2019). Visando determinar as vias apoptóticas induzidas por ZIKV em GBM, Li e colaboradores criaram vetores de expressão para as diferentes proteínas do vírus em um estudo de 2019. Os resultados do trabalho sugeriram que a proteína NS5 participa na indução da morte celular deste tumor (LI et al., 2019). O acúmulo de evidências a respeito do potencial terapêutico do ZIKV também acelerou a busca pelos receptores utilizados por este vírus durante o processo de penetração viral em células de GBM. Até o momento, temos evidência do papel dos receptores *NCAM1* (SRIVASTAVA et al., 2020) e *Integrina $\alpha\beta5$* (ZHU et al., 2020) na penetração do vírion do ZIKV em GBM. Em se tratando da mensuração da atividade oncolítica deste vírus, os resultados indicam um efeito robusto, haja vista a demonstração tanto *in vitro* como em modelos com organoides neurais 3D deste dano, com ausência de efeitos colaterais em células saudáveis diferenciadas da glia (MEANS et al., 2019). Finalmente, os resultados de experimentação em modelos *in vivo* inoculados com GBM subcutâneo, sugerem que o ZIKV pode atuar como um adjuvante, aumentando a sobrevida a longo prazo e gerando células T CD4⁺ de memória com tropismo tumoral (CRANE et al., 2020). Em resumo, diferentes estudos têm sido publicados com o objetivo de investigar os mecanismos moleculares que governam esse efeito, principalmente por meio de estratégias direcionadas a genes e vias específicas. Embora esses trabalhos tenham contribuído significativamente para a linha de pesquisa, abordagens exploratórias isentas de hipótese prévia, como a caracterização do perfil transcriptômico via sequenciamento de RNA total, são amplamente desejadas em se tratando de fenômenos biológicos emergentes, por fornecerem uma base imparcial para a abertura de novos questionamentos pertinentes ao entendimento destes mecanismos. Por fim, a elucidação dos mecanismos moleculares do efeito oncolítico do ZIKV em GBM passa necessariamente pela investigação da regulação epigenética dos transcritos de RNA celulares, que integra processos capazes de remodelar tanto a estabilidade quanto o destino funcional dos RNAs.

As marcações epigenéticas do RNA constituem uma camada essencial de regulação pós-transcricional (ROUNDTREE et al., 2017). O termo epitranscriptoma refere-se ao conjunto de modificações químicas covalentes presentes em moléculas de RNA, resultantes da ação coordenada de diversas cascatas bioquímicas ativadas por estímulos celulares distintos. Esse sistema regulatório envolve diferentes classes de enzimas, incluindo metiltransferases como METTL3/METTL14 (LIU et al., 2013) e pseU-sintases (CARLILE et al., 2019), metiltransferases de citosina da família NSUN (HUSSAIN et al., 2013) e editores de adenosina-para-I da família ADAR (WALKLEY & LI, 2017), desmetilases como FTO (JIA et al., 2011) e ALKBH5 (ZHENG et al., 2012), além de proteínas leitoras dessas marcas, como YTHDF/YTHDC (WANG et al., 2013), IGF2BPs (HUANG et al., 2018) e HNRNPC (LIU et al., 2015). Funcionalmente, tais modificações modulam o destino e a atuação dos transcritos, influenciando estabilidade, estrutura, *splicing*, eficiência traducional, exportação nuclear e localização subcelular (MEYER & JAFFREY, 2014). Do ponto de vista evolutivo, o surgimento e a conservação de marcas como m⁶A, m⁵C, pseU e I, investigadas nesta tese, conferiram aos organismos a capacidade de responder de forma rápida e adaptativa a estímulos e estresses ambientais. Em síntese, a epigenética do RNA representa um sistema dinâmico de regulação que ajusta o comportamento funcional do RNA conforme o contexto celular.

Em se tratando do escopo desta tese, as modificações de RNA participam de processos centrais da biologia tumoral e da resposta a infecções virais, sendo, portanto, particularmente pertinentes ao estudo da interação ZIKV-GBM. Em ambientes neoplásicos, como o microambiente glial maligno, marcas epitranscriptômicas desempenham papéis críticos na adaptação e plasticidade celular: a m⁶A controla programas de autorrenovação e diferenciação de células-tronco tumorais (CUI et al., 2017), enquanto m⁵C e pseU modulam eficiência translacional, homeostase proteica e capacidade de resposta a estresses metabólicos (NAKANO et al., 2016; EYLER et al., 2019). Alterações em escritores, leitores ou apagadores dessas marcas têm sido associadas à proliferação exacerbada, à aquisição de fenótipo invasivo e à resistência terapêutica em diversos tumores, incluindo gliomas de alto grau (YUAN et al., 2022). No contexto de infecções virais, múltiplos estudos demonstram que flavivírus remodelam profundamente o epitranscriptoma do hospedeiro e também modulam marcas presentes em seu próprio RNA genômico: por exemplo, a m⁶A regula a estabilidade e a competência replicativa dos genomas da família Flaviviridae (GOKHALE et al., 2016), enquanto padrões de edição A→I mediados por ADAR exibem reconfiguração significativa durante infecções congênitas por ZIKV (WALES-MCGRATH et al., 2023). Essas observações

reforçam que m⁶A e A→I constituem eixos regulatórios estratégicos para o equilíbrio entre replicação viral, detecção imunológica e resposta de estresse celular.

Tendo em vista a relevância dessa camada regulatória, torna-se notável que nenhum estudo anterior tenha buscado investigar o remodelamento do repertório epitranscriptômico de células de GBM infectadas por ZIKV. Nesse contexto, esta tese tem como objetivo principal caracterizar os mecanismos moleculares da infecção pelo ZIKV em células de GBM por meio de abordagens complementares, integrando evidências consolidadas na literatura à caracterização experimental do perfil transcriptômico e à descrição inédita das modificações epitranscriptômicas em uma linhagem de GBM infectada por esse vírus. Adicionalmente, busca-se elucidar o papel funcional do receptor de membrana *PTPRZI* na entrada viral nesse modelo tumoral.

2. Objetivo Geral

Investigar os mecanismos moleculares envolvidos na infecção por ZIKV em GBM, integrando evidências da literatura do campo a Abordagens experimentais.

2.1. Objetivos Específicos

- a) Revisar sistematicamente estudos que acessaram o transcriptoma de modelos de GBM infectados por ZIKV. Se possível, realizar uma análise de vias com os resultados dos estudos incluídos.
- b) Caracterizar experimentalmente o transcriptoma e o epitranscriptoma de células da linhagem U-87MG infectadas pela cepa PE243 do ZIKV.
- c) Avaliar a modulação da expressão e o papel do receptor de membrana *PTPRZI* na penetração do ZIKV em células U-87MG, de GBM.

3. Prólogo

Esta tese está organizada em três capítulos, estruturados de acordo com os objetivos específicos propostos. Cada capítulo é apresentado na forma de manuscrito científico, com formato e organização compatíveis com periódicos internacionais.

O **Capítulo 1** corresponde à revisão sistemática e meta-análise funcional das vias biológicas moduladas em modelos de GBM infectados por ZIKV. Este capítulo já foi preparado como manuscrito independente e submetido e revisado por pares no periódico *Microorganisms*. No momento, o mesmo encontra-se aguardando o aceite para publicação.

O **Capítulo 2** apresenta a caracterização experimental do transcriptoma e do epitranscriptoma da linhagem U-87MG infectada pela cepa PE243 do ZIKV, descrevendo pela primeira vez, no contexto de GBM, as modificações epitranscriptômicas induzidas por esta infecção. No momento, o manuscrito correspondente encontra-se redigido com base nos resultados disponíveis, de natureza preliminar e predominantemente descritiva e quantitativa. Assim, embora já estruturado em formato de artigo, o texto deste capítulo permanece sujeito a ajustes à medida que os experimentos complementares atualmente em andamento forem concluídos. Após a finalização dessas etapas experimentais, a versão atualizada do manuscrito será submetida para publicação em periódico internacional.

O **Capítulo 3** aborda a investigação funcional do receptor de membrana PTPRZ1 na penetração do vírion em células de GBM. Este capítulo também está estruturado como manuscrito e será submetido para publicação em periódico internacional após a conclusão de experimentos complementares.

Em conjunto, estes três capítulos permitem uma visão integrada e multidimensional da interação entre ZIKV e células de GBM, articulando evidências sistemáticas, análises ômicas e ensaios funcionais.

4. Capítulo 1.

Neste capítulo, realizamos uma revisão sistemática e uma análise funcional de vias biológicas dos artigos que avaliaram o perfil transcriptômico de células de GBM infectadas pelo ZIKV até 5 de março de 2025. O objetivo foi reunir e analisar criticamente todas as evidências disponíveis na literatura obtidas por meio dessa metodologia, a fim de compará-las com os resultados dos experimentos transcriptômicos conduzidos em nosso laboratório. Este trabalho foi submetido em 27/09/2025 e aguarda aceite para publicação no periódico *Microorganisms*.

Systematic Review

Transcriptomic Profile of Glioblastoma Multiforme Cells Infected with Zika Virus: A Systematic Review and Pathway Analysis

Diego Menezes¹; Clarisse Rezende Reis²; Izabela Mamede^{2,3}; Victor Emmanuel Viana Geddes^{3,4}; Renan Pedra de Souza^{1,5}; Renato Santana de Aguiar^{1,3*}

Academic Editor: Firstname
Lastname

Received: date

Revised: date

Accepted: date

Published: date

Citation: To be added by editorial
staff during production.

• **Copyright:** © 2025 by the
authors. Submitted for possible open
access publication under the terms
and conditions of the Creative
Commons Attribution (CC BY)
license
(<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

¹ Laboratory of Integrative Biology, Department of Genetics, Ecology and Evolution, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil. t.menezes.diego@gmail.com, renanpedra@gmail.com, santanarnt@gmail.com

² Laboratory of Genetics Biochemistry, Department of Biochemistry and Immunology, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil. clarisserezende@gmail.com, iza.mamede@gmail.com

³ D'OR Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil.

victor.geddes@gmail.com, santanarnt@gmail.com, iza.mamede@gmail.com

⁴ IDOR Pioneer Science Initiative, Rio de Janeiro, Brazil. victor.geddes@gmail.com.

⁵ Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Belo Horizonte, Brazil.

renanpedra@gmail.com

* Correspondence: santanarnt@gmail.com; Tel.: +5531995087108.

Abstract

Glioblastoma multiforme (GBM) is an aggressive glial tumor with limited therapeutic options. Zika virus (ZIKV) has demonstrated activity against GBM; however, the cellular pathways behind this interaction remain unclear. We systematically reviewed open-access primary studies assessing differentially expressed genes (DEGs) in GBM models infected with wild-type or engineered ZIKV using transcriptomic approaches (inclusion criteria); reviews, restricted-access studies, commentaries, editorials, preprints, conference abstracts and articles lacking data or not meeting these conditions were excluded (PROSPERO CRD420251077092). We performed a pathway analysis of reported DEGs. PubMed and Google Scholar were searched up to 5 March 2025; 139 records were identified and five met the eligibility criteria. Risk of bias was evaluated using an adapted ToxRTTool for *in vitro* experiments and the SYRCLE RoB tool for *in vivo* models. Altogether, 4,360 genes were reported as upregulated and 2,072 as downregulated; 12 genes (*DNAJB9*, *SESN2*, *PMAIP1*, *PPP1R15A*, *KLF4*, *ATF3*, *IFNB1*, *IFNL1*, *ANKRD33B*, *ZC3HAV1*, *OASL*, and *CCL5*) were consistently upregulated. Pathway analysis of the studies providing complete DEG lists identified 23 commonly enriched pathways mostly related to interferon signaling. These findings may help guide future research in this field; nevertheless, methodological heterogeneity limits comparability, reinforcing the need for standardized protocols. Funding: ITpS, CNPq and FAPEMIG.

Keywords: “Oncolytic viruses”; Glioblastoma; “Zika Virus (ZIKV)”; Transcriptome; “Pathway analysis”

1. Introduction

Glioblastoma multiforme (GBM) is a primary malignant glial tumor (glioma) that originates from the differentiation of astrocytes. It is classified as a grade IV tumor on the World Health Organization (WHO) malignancy scale [1], representing the most aggressive and the most common type of central nervous system (CNS) cancer. With an estimated 10,500 new diagnoses per year in the United States, GBM accounts for approximately 80% of all primary malignant CNS tumors [2]. The average age at diagnosis is 64 years and the median overall survival following diagnosis ranges from 12 to 15 months [3,4]. The combination of the tumor's aggressiveness and the scarcity of effective therapeutic options has intensified the demand for targeted treatments, fostering a growing research line within the field of oncology that offers hope for patients who currently lack viable medical alternatives.

Among the promising therapeutic strategies to emerge over the past decade is immunotherapy, which seeks to harness the immune system to target and eliminate tumor cells [5]. In parallel, the field of oncolytic virotherapy has emerged as an even bolder approach. While immunotherapy aims to "surround the borders" of cancer cells, oncolytic viruses aim to cross those borders, destroying the enemy from within. These oncolytic viruses (OVs), whether wild-type or genetically engineered, have been experimentally proven to selectively replicate within cancer cells, leading to their destruction without harming healthy cells in the host organism [6].

As of now, 13 clinical trials investigating OVs for GBM treatment have been registered, including models based on herpesviruses, adenoviruses, parvoviruses, polioviruses, and reoviruses [7]. More recently, scientific interest in Zika virus (ZIKV) has increased following the outbreaks of ZIKV-associated fever in the Americas [8]. Research on ZIKV as a potential OV against GBM reported its first positive results in 2017, when Zhu and collaborators demonstrated oncolytic activity in three GBM cell lines [9]. Since then, numerous studies have been published, aiming to investigate the molecular mechanisms underlying this effect, primarily through targeted molecular and mechanistic strategies [10–13]. Although these works have significantly contributed to the field, hypothesis-free exploratory approaches, such as global cellular pathways profiling via total RNA sequencing (RNA-seq), are widely advocated for emerging biological phenomena, as they provide an unbiased foundation for the development of new hypotheses. In this context, a systematic review that integrates the available evidence from multiple sources is warranted.

This study systematically reviews the available evidence on the transcriptomic landscape of ZIKV-infected GBM cells, emphasizing the key genes implicated in this process. In addition, we performed a pathway analysis using the differentially expressed genes (DEGs) reported in the included studies to integrate findings across different transcriptomic reports.

2. Materials and Methods

We registered a study protocol on the International Prospective Register of Systematic Reviews (PROSPERO: CRD420251077092). Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-analysis (PRISMA) was adopted as a guideline for reporting this systematic review [14]. Inclusion criteria were open-access primary studies that assessed DEGs in GBM models infected with ZIKV using a transcriptomic approach. Eligible studies can use either wild-type ZIKV or various ZIKV-based engineered models as the main intervention, as well as different GBM models as the experimental system. Exclusion criteria were reviews, restricted-access studies, commentaries, editorials, preprints, conference abstracts, and other articles lacking full data. Additionally, primary studies were excluded if they did not assess DEGs through a transcriptomic experimental design, did not use wild-type ZIKV or ZIKV-based engineered models as the main intervention, or did not employ a GBM model as the experimental system.

Study selection was conducted in three phases: database search (identification), title and abstract screening and full-text assessment for eligibility. Identification was performed by searching on two databases: PubMed and Google Scholar. Cross-referencing was used to identify additional records studies from the reference lists of the reviews retrieved in our search. We included all studies published up to March 5, 2025, using the search arguments listed in the supplementary material (Appendix S1). Two independent researchers conducted the screening and full-text eligibility assessment. A systematic review flowchart was prepared following PRISMA specifications (Fig. S1). Only studies using human GBM models that provided the complete list of DEGs, either reported within the article or deposited in public databases, were selected for gene overlap assessment and pathway analysis; therefore, no additional methods to assess bias from missing results were necessary.

Data were manually extracted by a single reviewer (DM) without the use of standardized forms. Full-text articles were individually screened, and relevant information was systematically collected and entered a structured outcome table, which was subsequently reviewed by all co-authors. The table included the following variables: *Study*, *Virus strain/viral model*, *Multiplicity of Infection (MOI) or PFU/cell*, *RNA collection time (hpi)*, *Species*, *Model*, *Method*, *Outcome*, *Mean sequencing depth (million reads/sample)*, *Results (DEGs)*, and *Observations* (Table 1). In the Results (DEGs) section, genes were classified as Upregulated or Downregulated. For DEGs identified via Reverse Transcriptase-quantitative Polymerase Chain Reaction (RT-qPCR), gene symbols were listed. For those obtained via RNA-seq, only the total number of genes in each category was reported, in order to preserve the table's clarity and readability.

All DEGs were manually curated using the Multi-Symbol Checker provided by the HUGO Gene Nomenclature Committee (HGNC) [15] to standardize gene nomenclature. Gene identifiers from *Ensembl* [16] and *NCBI* [17] were mapped to approved HGNC gene symbols. Only approved symbols were retained, while unmatched entries, aliases and deprecated symbols were excluded to avoid redundancy and to ensure consistency across studies. A final dataset was compiled, including all DEGs identified through RNA sequencing between infected and non-

infected human GBM models, together with study authorship and the corresponding expression pattern (Table S1). From this dataset, overlapping genes among studies were assessed through Venn diagrams generated in R [18], with the support of the following packages: *readxl* [19], *dplyr* [20], *tidyverse* [21], *VennDiagram* [22], *png* [23], *ggplotify* [24], *ggpubr* [25] and *grid* [18].

The risk of bias was assessed by two independent researchers using one of two instruments, depending on the study design. *In vitro* studies were evaluated using the ToxRTool [26], a tool developed to assess the reliability of toxicological data, which classifies studies into Klimisch categories: reliable without restrictions (score 1), reliable with restrictions (score 2), and not reliable (score 3) [27]. The final score assigned to each study was included in the outcome table under the variable *ToxRTool score*. Since there are no standardized tools for evaluating bias in virotherapy-based in vitro studies to the present date, ToxRTool was adapted for the context of this review (Appendix S2). *In vivo* studies were assessed using SYRCLE's Risk of Bias Tool [28], an instrument based on the Cochrane Risk of Bias Tool, applicable to any type of intervention in preclinical animal studies.

To investigate pathway alterations across the articles, we performed gene set enrichment analysis using the *fgsea* [29] package in R. Publicly available RNA-seq differential expression (DE) results were retrieved and processed as follows: Count matrices were processed using the *DESeq2* pipeline [30]. Gene names were standardized using *bioMart* [31]. Gene set enrichment was performed against the C5 Gene Ontology Biological Process (GO:BP) collection (version 2025.1) from *MSigDB* [32]. All tested genes per comparison were included in *fgsea* analysis and they were ranked by their log2FoldChanges. Pathways with adjusted p-values < 0.01 and |normalized enrichment score (NES)| > 1 were considered significantly enriched. The top 10 absolute NES pathways in each dataset were intersected for visualization in *ggplot2* [33], since some pathways were present in the top 10 of more than 1 dataset, this amounted to 23 pathways. No formal analyses to explore heterogeneity, sensitivity analyses, or certainty assessments were conducted, as the synthesis was descriptive, based on fixed thresholds, and focused on transcriptomic pathway data rather than quantitative effect estimates.

3. Results

3.1. Study selection

The literature search retrieved 136 records from the two databases. The cross-referencing screening on the retrieved reviews added 3 other primary articles, leading to 139 records in total. We excluded 65 studies on the title and abstract screening step. Another 69 records were excluded after full-text assessment: 42 investigated ZIKV infection in GBM models without performing differential expression analysis; 18 were unavailable in full text (10 abstracts, 7 commentaries, and 1 project); 3 were reviews; 2 were non-ZIKV studies; 2 were non-GBM studies; 2 were preprints; and 1 was a restricted-access article. Ultimately, 5 studies met the eligibility criteria and were included in the review (Fig. S1) [9,34-37].

3.2. Study characteristics

Data extracted from the methods, results, and figures sections of the eligible studies were combined to construct the outcome table (Table 1).

Table 1. Summary of experimental parameters and outcomes reported in the included studies. Variables include Study, Virus strain and model, MOI or PFU/cell, Time point (hours post-infection, hpi), Species, Model system, Method, Outcome, Mean sequencing depth (million reads/sample), Differentially expressed genes (DEGs), and Observations. For the DEGs variable, individual gene symbols are listed when derived from RT-qPCR analyses, while total DEG counts are reported for RNA-seq results.

Study	ToxRTool score	Virus strain/ viral model	MOI or PFU/cell	RNA collection time (hpi)	Species	Model	Method	Outcome	Mean sequencing depth (million reads/sample)	Results (DEGs)		50 Observations
										Upregulated	Downregulated	
Bulstrode <i>et al.</i> , 2022 [34]	1	ZIKVPE243/ mCherry	10	48-72*	<i>H. sapiens</i>	Case: Primary HR GBM; Control: Primary MR GBM (<i>in vitro</i>).	RNA-seq	DEGs in highly refractory (HR) vs moderately refractory (MR) GBM following ZIKV infection.	-.**	13	6	* The study does not clearly state the post-infection time point used for the RNA-seq analysis. ** The study did not report sequencing metrics.
						Case: ZIKV-infected primary GBM; Control: Uninfected primary GBM (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-.**	20	1	
Chen <i>et al.</i> , 2018 [35]	2	ZIKVFSS13025/ LAV	1	48	<i>H. sapiens</i>	Case: ZIKV-infected 4121 GSCs; Control: Uninfected 4121 GSCs (<i>in vitro</i>).*	RNA-seq	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	38.2	528	19	* The study employed <i>in vivo</i> models; however, it did not conduct transcriptomic analyses on <i>in vivo</i> -derived cells.
						Case: ZIKV-infected 4121 GSCs; Control: Uninfected 4121 GSCs (<i>in vitro</i>).*	RT-qPCR	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>CDKN2B, CXCL10, CCL5, DDIT3, GADD45B</i>	<i>CCL2</i>	
Chen <i>et al.</i> , 2022 [36]	3	ZIKVGZ01 / WT	-*	24	<i>H. sapiens</i>	Case: ZIKV-infected Primary (GBM#27) cells; Control: Uninfected Primary (GBM#27) cells (<i>in vitro</i>).	RT-qPCR	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>IFNB1, CCL5, CXCL10, CXCL11</i>	-	* MOI not reported for these experimental conditions.
				48		Case: ZIKV-infected Primary (GBM#27) cells; Control: Uninfected Primary (GBM#27) cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>IFNB1, CCL5, CXCL10, CXCL11</i>	-	
				24		Case: ZIKV-infected Primary (456 GSC) cells; Control: Uninfected Primary (456 GSC) cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>CCL5, CXCL10, CXCL11</i>	-	

Study	ToxRTTool score	Virus strain/ viral model	MOI or PFU/cell	RNA collection time (hpi)	Species	Model	Method	Outcome	Mean sequencing depth (million reads/sample)	Results (DEGs)		Observations
										Upregulated	Downregulated	
Chen <i>et al.</i> , 2022 [36]	3	ZIKVG Z01/ WT	-*	48	<i>H. sapiens</i>	Case: ZIKV-infected Primary (456 GSC) cells; Control: Uninfected Primary (456 GSC) cells (<i>in vitro</i>).	RT-qPCR	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>IFNB1, CCL5, CXCL10, CXCL11, RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT3</i>	-	* MOI not reported for these experimental conditions.
				48		Case: ZIKV-infected Primary (456 GSC) cells; Control: Anti-IFNAR1 + ZIKV-infected Primary (456 GSC) cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs Anti-IFNAR1 + ZIKV-infected GBM.	-	<i>RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT3, CXCL10</i>	-	
				24	<i>M. musculus</i>	Case: ZIKV-infected CT-2A cells; Control: Uninfected CT-2A cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>IFNA1, IFNB1, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11</i>	-	
				48		Case: ZIKV-infected CT-2A cells; Control: Uninfected CT-2A cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>IFNA1, IFNB1, RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF7, CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11</i>	-	
				48		Case: ZIKV-infected CT-2A cells; Control: Anti-IFNAR1 + ZIKV-infected CT-2A cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs Anti-IFNAR1 + ZIKV-infected GBM.	-	<i>RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF7</i>	-	
				24		Case: ZIKV-infected GL261 cells; Control: Uninfected GL261 cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>CCL5, CXCL9, CXCL10, CXCL11, RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF7</i>	-	

Study	ToxRTool score	Virus strain/ viral model	MOI or PFU/cell	RNA collection time (hpi)	Species	Model	Method	Outcome	Mean sequencing depth (million reads/sample)	Results (DEGs)		Observations
										Upregulated	Downregulated	
Chen <i>et al.</i> , 2022 [36]	3	ZIKVG Z01/ WT	~*	48	<i>M. musculus</i>	Case: ZIKV-infected GL261 cells; Control: Uninfected GL261 cells (<i>in vitro</i>).	RT-qPCR	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>CCL5, CXCL9, CXCL10</i>	-	* MOI not reported for these experimental conditions. **The study does not clearly specify the viral strain used in the experiment. ***The list of DEGs from this experiment was not made available.
				24		Case: ZIKV-infected GL261 cells; Control: Anti-IFNAR1 + ZIKV-infected GL261 cells (<i>in vitro</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs Anti-IFNAR1 + ZIKV-infected GBM.	-	<i>RSAD2, IFIT1, IFIT2, IFIT3, IRF7</i>	-	
		ZIKVFS S13025/ WT	0.2	288		Case: Anti-PD-L1 + ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with CT-2A; Control: ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with CT-2A (<i>in vivo</i>).		DEGs in Anti-PD-L1 + ZIKV-infected vs ZIKV-infected GBM.	-	<i>CCL5, CXCL10, CXCL11, ISG15, RSAD2, IFIT1, IL6, IFNB1, IFNG</i>	-	
				720		Case: Anti-PD-L1 + ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with CT-2A; Control: ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with CT-2A (<i>in vivo</i>).	RNA-seq	DEGs in Anti-PD-L1 + ZIKV-infected vs ZIKV-infected GBM.	-	<i>IL6, IFNB1</i>	-	
				360		Case: ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with GL261; Control: Uninfected C57BL/6N mice inoculated with GL261 (<i>in vivo</i>).		DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	44.3	_***	_***	
				528		Case: Anti-PD-L1 + ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with GL261; Control: ZIKV-infected C57BL/6N mice inoculated with GL261 (<i>in vivo</i>).		DEGs in Anti-PD-L1 + ZIKV-infected vs ZIKV-infected GBM.	43.2	_***	_***	

201

202

Study	ToxRTTool score	Virus strain/ viral model	MOI or PFU/cell	RNA collection time (hpi)	Species	Model	Method	Outcome	Mean sequencing depth (million reads/sample)	Results (DEGs)		Observations
										Upregulated	Downregulated	
Chen <i>et al.</i> , 2023 [37]	1	ZIKVG Z01/ WT	1	24	<i>H. sapiens</i>	Case: ZIKV-infected U251 cells; Control: Uninfected U251 cells (<i>in vitro</i>).	RT-qPCR	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>TNF</i>	-	-
				48				DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>OASL, OAS2, IFIT2, IFIT3, ISG15, TRIM22, TNF</i>	-	
				96				DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>TNF</i>	-	
				144				DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	-	<i>TNF</i>	-	
				48			RNA-seq	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	21.8	3460	1505	
Zhu <i>et al.</i> , 2017 [9]	1	ZIKVP araiba_01/ 2015 and ZIKVD akar415 19/ WT	5	36-48*	<i>H. sapiens</i>	Case: ZIKV-infected 3565 and 4121 GBM cells; Control: ZIKV-infected 3565 and 4121 NSTC cells (<i>in vitro</i>). **	RT-qPCR	DEGs in ZIKV-infected GBM vs ZIKV-infected NSTC.	-	-	<i>IFNAR1, STAT1, IRF1, IFIT1, OAS2, IFH1</i>	* The study does not clearly state the post-infection time point used for the RNA-seq analysis. Also, the study used two** and three*** different GBM cell lines for the transcriptomic analysis.
						Case: ZIKV-infected 3565, 387 and 4121 cells; Control: Uninfected 3565, 387 and 4121 cells (<i>in vitro</i>). ***	RNA-seq	DEGs in ZIKV-infected vs non-infected GBM.	62.7	1338	726	

The included studies employed a variety of ZIKV strains and experimental models. Bulstrode et al. (2022) [34] and Chen et al. (2018) [35] used a recombinant reporter ZIKV-mCherry construct and an attenuated virus, respectively. Chen et al. (2022) [36], Chen et al. (2023) [37] and Zhu et al. (2017) [9] utilized wild-type (WT) ZIKV strains. Across the five studies, five distinct strains were reported: ZIKVPE243 and ZIKVParaiba_01/2015 (American), ZIKVFSS13025 and ZIKVGZ01 (Asian), and ZIKVDakar41519 (African) with some overlap between studies. Although certain studies used multiple strains, transcriptomic analyses were typically conducted using only one. Notably, Chen et al. (2022) [36] was the only study to report DEGs derived from two distinct strains (ZIKVFSS13025 and ZIKVGZ01).

Diversity was also observed in the cellular and murine models employed to evaluate the virus infection. Four studies employed primary GBM cultures derived from patient tumors [9,34-36], while two studies used immortalized cell lines - U251 (human, Sigma-Aldrich #9063001), CT-2A (murine, Sigma-Aldrich #SCC194), and GL261 (murine, BCRJ #0299) [36, 37]. *In vivo* models were based on the C57BL/6 mouse strain, used by three studies [9,35,36]; in addition, Chen et al. (2018) [35] also employed BALB/c nude mice to evaluate ZIKV-mediated tumor inhibition. Importantly, only Chen et al. (2022) [36] performed transcriptomic profiling on *in vivo*-derived GBM tissue, making it the sole source of *in vivo* DEG data included in the outcome table (Table 1).

Regarding the experimental design, the included studies employed a range of multiplicities of infection (MOIs), from 0.2 to 10 (median = 1; SD = 4.12). Post-infection RNA collection time also varied considerably between studies that worked with *in vitro* models, ranging from 24 to 144 hours (median = 48; SD = 30.63). One study [36] did not clearly report the MOI, and two studies [9, 34] lacked information about RNA collection time in their methods. In both cases, the corresponding data were not included in the outcome table and statistical analysis. The studies presented diverse outcomes assessed primarily by RT-qPCR (16 comparisons; 72.72%) and, to a lesser extent, by RNA-seq (6 comparisons; 27.27%). All five studies investigated DEGs between ZIKV-infected and non-infected GBM samples. Furthermore, some studies explored case/control comparisons within the infected groups, aiming to investigate: the effect of antibody neutralization on gene expression during infection [36], transcriptomic differences between GBM lines classified as highly and moderately refractory to ZIKV infection [34] and the expression pattern of GBM vs healthy nuclear transfer stem cells (NTSCs), both infected with ZIKV [9].

A ToxRTool24 reliability score was assigned to all five studies, as they all included *in vitro* experiments. Three studies were classified as "reliable without restrictions" (score 1) [9,34,37], one as "reliable with restrictions" (score 2) [35] and one as "not reliable" (score 3) [36d]. The three studies that conducted *in vivo* experiments were further evaluated with SYRCLE's Risk of Bias Tool, which does not provide an overall quality score. In general, these studies received a "yes" judgement, indicating a low risk of bias, for items 2, 9, and 10, which assess the description of baseline characteristics, selective outcome reporting, and

other potential sources of bias, respectively. Conversely, most studies received a “no” judgement, indicating a high risk of bias, for items 1 and 3-8 (Fig. 1).

Author	SYRCLE question									
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10
Chen et al., 2018 [35]	-	+	-	-	-	-	-	-	+	+
Chen et al., 2022 [36]	-	+	-	-	-	+	-	-	+	+
Zhu et al., 2017 [9]	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-

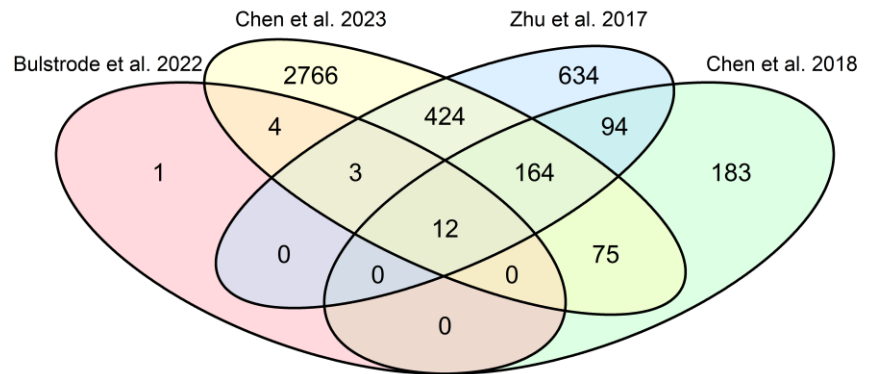
Yes	+
No	-

Figure 1. SYRCLE's Risk of Bias (RoB) tool evaluation matrix. Summary of the categorical assessment for each item pointed by the instrument. 1 - Sequence generation, 2 - Baseline characteristics, 3 - Allocation concealment, 4 - Random housing, 5 - Experimental Blinding, 6 - Random outcome assessment, 7 - Outcome assessment Blinding, 8 - Incomplete outcome data, 9 - Selective outcome reporting, 10 - Other sources of bias. Responses are color-coded as follows: Yes (green) and No (orange).

3.3. Twelve genes were consistently upregulated in ZIKV-infected GBM cell lines.

For the sake of comparability among studies, only DEGs derived from RNA sequencing experiments comparing the transcriptomic profiles of ZIKV-infected vs non-infected human GBM cells were collected for further analysis (Table S1). Chen et. al., 2022 [36], which assessed the transcriptome of ZIKV-infected murine GBM, was therefore not included in the dataset. Venn diagrams (Fig. 2) presenting the intersection of the absolute number of upregulated (A) and downregulated (B) genes were constructed.

A



B

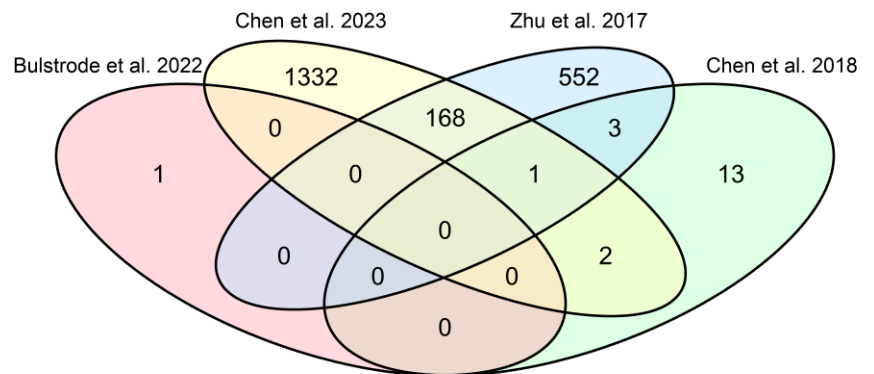


Figure 2. Differentially Expressed Genes (DEGs) in ZIKV-infected human GBM cells. Venn diagrams displaying the number of upregulated (A) and downregulated (B) genes identified by RNA sequencing in ZIKV-infected (case) vs non-infected (control) human GBM cells across four of the five studies included in this review.

Overall, a total of 4360 genes were reported as upregulated and 2072 as downregulated across the four studies [9,34,35,37] included in this analysis (Fig. 2). In each of them, the number of upregulated genes exceeded the number of downregulated genes. Notably, 145 genes (2.3%) were found to be upregulated in at least one study and downregulated in at least another study, suggesting inconsistent regulation patterns across different experimental models. Twelve genes were reported as upregulated in the four studies: DnaJ homolog, subfamily B, member 9 (*DNAJB9*; endoplasmic reticulum chaperone), Sestrin-2 (*SESN2*; oxidative stress sensor), Phorbol-12-Myristate-13-Acetate-Induced Protein 1 (*PMAIP1*; pro-apoptotic factor), Protein phosphatase 1 regulatory subunit 15A (*PPP1R15A*; stress-induced regulator of protein synthesis), KLF Transcription Factor 4 (*KLF4*; cell-cycle and differentiation regulator), Activating transcription factor 3 (*ATF3*; immediate early stress-response

gene), Interferon Beta 1 (*IFNB1*; type I interferon), Interferon-lambda 1 (*IFNL1*; type III interferon), Ankyrin Repeat Domain 33B (*ANKRD33B*; transcriptional regulator with unclear function), Zinc Finger CCCH-Type Antiviral Protein 1 (*ZC3HAV1*; antiviral RNA-binding protein), 2'-5'-Oligoadenylate Synthetase Like (*OASL*; interferon-stimulated antiviral enzyme) and CC Motif Chemokine Ligand 5 (*CCL5*; proinflammatory chemokine). Most of these genes point to a coordinated innate defense response to arboviruses (Fig. 2A). In contrast, no gene was found to be downregulated across all four studies (Fig. 2B).

3.4. Pathway analysis identified 23 enriched molecular processes

A pathway analysis was performed for the three studies that provided the complete list of DEGs or the counts results in ZIKV-infected GBM, either within the main article or through publicly available databases: Chen et al. 2018 [35] (mean depth = 38.2M reads/sample), Chen et al. 2023 [37] (mean depth = 21.8M reads/sample), and Zhu et al. 2017 [9] (mean depth = 62.7M reads/sample) (Table 1). Differential expression results from Zhu 2017 [9], (GSE102924) and Chen 201833 (GSE114907) were imported directly from processed tables. For Chen 2023 [37] (GSE234128), raw count data were extracted for U251 cell line under ZIKV-infected and non-infected (NF) conditions. To identify conserved biological programs across distinct glioma-related conditions, we performed gene set enrichment analysis (GSEA) using the GO:BP collection on three transcriptomic comparisons: (i) Zhu et al., 2017 [9], Glioma stem cells infected with ZIKA virus Dakar strain, (ii) Chen et al. 2018 [35], Zika virus-infected glioblastoma neurospheres; and (iii) Chen et al. 2023 [37], U251 glioma cells infected with Zika virus. Differential expression analyses were conducted using *DESeq2* [30] for count-based datasets and retrieved directly when available. Pathways present in all the studies with a p adjusted lower than 0.01 were included in the analysis (Fig. 3).



Figure 3. Concordant enrichment of Gene Ontology Biological Processes (GO:BP) across three ZIKV-infected GBM datasets. Dot plot representing significantly enriched GO:BP pathways (adjusted $p < 0.01$, $|NES| > 1$) found in the intersection of three transcriptome differential expression analyses. Pathways are ordered by normalized enrichment score (NES). Each dot represents the NES of the corresponding pathway in each dataset, where color indicates the NES direction and intensity, and size reflects the adjusted p value.

Full pathway results are available on the Table S2. Chen et al., 2018 [35] yielded 384 enriched pathways, Chen et al., 2023 [37] yielded 455 enriched pathways and Zhu et al., 2017 [9] yielded 763 enriched pathways.

The three studies [9,35,37] shared 75 enriched pathways; from these, we display the top 23 NES pathways. (Fig. 3). These included regulation of viral genome replication and viral cycle, which in turn activated cellular pathways such as the cellular response to viruses, defense response to viruses, regulation of immune system process, positive regulation of immune response, cytokine-mediated signaling, antiviral innate immune response and interferon-mediated signaling. These pathways collectively reflect the activation of innate immune programs, particularly those centered on type I and type III interferon signaling against virus replication in a cellular scenario. Together, these findings reiterate the strong concordance across datasets; common immune and antiviral programs are consistently enriched; while dataset-specific pathways exhibited lower enrichment and adjusted p values within individual studies, indicating context-dependent magnitudes of pathway activation.

4. Discussion

A search conducted up to March 5, 2025, identified 47 studies investigating ZIKV infection in GBM models. Of these, 42 explored

various strategies to test their hypotheses, either through targeted approaches or by directly assessing the effects of ZIKV on GBM models. Only five studies examined the transcriptomic profiles of ZIKV-infected GBM cells, and none addressed epitranscriptomic signatures. The scarcity of differential expression data highlights the need to expand these studies, with particular attention to maintaining standardized experimental designs to enable comparability. This limitation was evident in the present review, as the five included studies varied substantially in experimental design, including viral strains, *in vitro* and *in vivo* models, infection time points and doses (MOI), research objectives, and methodologies. While such heterogeneity serves an exploratory function in the early investigation of a novel phenomenon, it also presents a significant barrier to data uniformity across studies.

Regarding strain variability, recent ZIKV lineages isolated in the Americas have been associated with stronger neurological symptoms compared to Asian and African isolates [38,39]. Accordingly, one could hypothesize that experiments using American ZIKV strains [9,34] might elicit a stronger response in GBM cells, resulting in a higher number of upregulated genes. However, this was not confirmed. The observed discrepancy is likely influenced more by under-reporting than by strain-specific characteristics: the complete list of DEGs and sequencing quality metrics were not available in Bulstrode et al. (2022) [34], precluding a definitive analysis. Comprehensive reporting of such information, particularly mean RNA sequencing depth, is crucial, as this metric is positively correlated to the likelihood of identifying rare transcripts. For this reason, a minimum mean depth of 25M reads/sample is recommended for transcriptomic studies [40]. Among the five studies reviewed here, two met this requirement [9,35], one reached 21.8M reads/sample, slightly below the threshold [37] and two did not report sequencing metrics [34,36]. The optimization of experimental models has long been recognized as a major challenge in studies conducting transcriptomic analyses, as it critically affects data reproducibility and biological interpretation [41,42], reinforcing the urgent need for consistency in protocols.

The lack of essential methodological information due to poor reporting was not limited to sequencing metrics and constituted a barrier to data synthesis. This reporting bias was evaluated using quality checklists. Although some studies failed to report basic protocol elements, such as the use of negative controls, number of replicates [35], cell line origin, MOI and route of administration [36], we included all studies in our analysis regardless of their ToxRTool [26] score, as our adapted version of the tool has not yet been validated. Nevertheless, the classification of Chen et al., 2022 [36], as “not reliable” should be taken into account when interpreting that study’s results and conclusions. For studies employing *in vivo* models, evaluation with the SYRCLE RoB tool revealed a high risk of bias for most checklist items. With the exception of items 2 (baseline characteristics), 9 (selective outcome reporting), and 10 (other potential sources of bias), studies did not meet the requirements for proper allocation and blinding across several experimental steps. Despite this, the checklist does not recommend assigning a summary score, as this

“...inevitably involves assigning ‘weights’ to specific domains in the tool, and it is difficult to justify the weights assigned,” which also “...might differ per outcome and per review” [28]. Therefore, we did not weigh the studies’ results based on their SYRCLE evaluation. However, this choice should be acknowledged as a potential source of heterogeneity and bias that may weaken the strength and generalizability of our conclusions, emphasizing the need for greater standardization and transparency in future ZIKV-GBM transcriptomic studies.

In total, twelve genes were found to be consistently upregulated across all five studies: *DNAJB9*, *SESN2*, *PMAIP1*, *PPP1R15A*, *KLF4*, *ATF3*, *IFNB1*, *IFNL1*, *ANKRD33B*, *ZC3HAV1*, *OASL*, and *CCL5*. This gene set integrates the stress response regulators *DNAJB9* [43], *SESN2* [44], *PPP1R15A* [45], *ATF3* [46], and *KLF4* [47], with the canonical antiviral/innate immune mediators *IFNB1* [48], *IFNL1* [49], *ZC3HAV1* [50], *OASL* [51], and *CCL5* [52]. Their coordinated induction suggests that ZIKV infection elicits a multifaceted response in GBM cells, where cellular stress pathways converge with type I/III interferon signaling and chemokine-mediated immune activation. Mechanistically, this implies that ZIKV triggers endoplasmic reticulum stress and unfolded protein response elements, which intersect with interferon-stimulated gene networks to promote immune recruitment. This coordinated innate immune response in GBM cells may underlie the antiviral resistance mechanisms observed during ZIKV infection. The limited gene overlap likely reflects the high methodological and biological heterogeneity across studies. Differences in ZIKV strains, infection time points, and experimental models (cell lines vs. animal models) inherently influence transcriptional responses [53]. Moreover, GBM itself comprises multiple molecular subtypes with distinct baseline transcriptomic profiles, which may modulate the host response to infection. Thus, the small set of common DEGs may represent the core, most conserved elements of ZIKV-induced stress and immune activation in glioblastoma models [54].

Interestingly, among the consistently upregulated genes, *PMAIP1* (NOXA) stands out as the only canonical pro-apoptotic effector, in contrast to the other genes, which are primarily associated with cellular stress responses and antiviral immune signaling, being commonly observed in a wide range of viral infections. The induction of *PMAIP1* is particularly relevant, as it encodes a BH3-only protein that directly promotes mitochondrial outer membrane permeabilization and caspase activation, thereby committing the cell to apoptosis [55]. This selective activation suggests that ZIKV infection may not only trigger a generic antiviral response but also engage GBM cell death pathways, positioning *PMAIP1* as a promising target for further functional studies. The presence of *ANKRD33B* (a transcript expressed mainly in brain and kidney tissue) [56] among the upregulated genes is also notable. Although its functional role in this context remains unclear due to the limited research available, the conserved upregulation observed across studies highlights it as worthy of further investigation. No gene was found to be consistently downregulated across the four studies. Moreover, the number of downregulated genes in each study was substantially lower than that of upregulated genes. This pattern may reflect ZIKV’s relatively mild clinical

manifestations, potentially indicating a lower degree of host gene suppression by its replication machinery compared to other medically relevant arboviruses [57,58]. The pathway analysis extended the findings from the overlap investigation of commonly upregulated genes. The 23 commonly enriched pathways point toward core mechanisms of the antiviral innate immune response, which operate in a coordinated manner to detect, contain, and eliminate viral infections by mediating viral RNA degradation and inhibiting viral replication, while simultaneously regulating the intensity and duration of the immune response.

This systematic review highlights the convergent, although limited, transcriptomic evidence available on ZIKV infection in GBM models, revealing a consistent upregulation of key interferon-related genes and pathways involved in the antiviral innate immune response. Notably, the pro-apoptotic effector *PMAIP1* and the poorly characterized gene *ANKRD33B* emerge as potentially relevant targets for future investigations of ZIKV-induced apoptosis in GBM cells. Nonetheless, important limitations must be acknowledged. Restriction to open-access studies, limiting inclusion for pathway analysis to studies reporting complete DEG lists, and reliance on published transcriptomic datasets, which may have varying reporting standards, constituted limitations to the review process. Additionally, the small number of eligible studies, the heterogeneity of experimental designs, and inconsistencies in methodological reporting introduce potential biases that constrain the strength of our conclusions. Moreover, the adapted ToxRTool [26] instrument used in our quality assessment has not yet been formally validated. These limitations underscore the need to replicate transcriptomic profiling of this virus-cell interaction under uniformed protocols with rigorous data reporting, as well as to develop appropriate quality assessment instruments designed specifically for the context of infected *in vitro* models. Integrative approaches that incorporate the epitranscriptome of ZIKV-infected GBM cells as an additional omics layer are also warranted. Future systematic reviews should explore complementary experimental strategies, such as immunological blockade, gene knockout, and viability assays in order to elucidate the mechanisms underlying ZIKV's viral cycle in GBM and to promote greater standardization of study designs in the research field.

Supplementary Materials: The following supporting information can be downloaded at: <https://www.mdpi.com/article/doi/s1>, Appendix S1: List of terms used in each database during the searching step of the PRISMA flowchart; Figure S1: PRISMA flowchart; Table S1: Full list of DEGs included in the Overlapping (Venn Diagrams) analysis; Appendix S2: Adapted ToxRTool for the evaluation of oncolytic virus studies; Table S2: Full pathway analysis results.

Author Contributions: Conceptualization, D.M., C.R.R., I.M., V.E.V.G, R.P.S and R.S.A.; methodology, D.M., C.R.R., I.M. and V.E.V.G; software, D.M., C.R.R. and I.M.; validation, R.P.S and R.S.A.; formal analysis, D.M., C.R.R. and I.M.; investigation, D.M., C.R.R., I.M. and V.E.V.G; data curation, D.M.; writing—original draft preparation, D.M. and I.M.; writing—review and editing D.M., C.R.R., I.M., V.E.V.G, R.P.S and R.S.A.; visualization, D.M.; supervision, R.P.S and

R.S.A.; project administration, R.P.S and R.S.A.; funding acquisition, R.P.S and R.S.A. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by: Instituto Todos pela Saúde – ITpS, grant numbers C1294, C2024-0779 and A113; CNPq, grant number 315592/2021-4; INCT-One Health CNPq, grant number 405786/2022-0 and FAPEMIG, grant numbers APQ-02826-24 and APD-00520-25.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The datasets generated during the current study are available from the corresponding author upon reasonable request. Expression profile data analyzed in this study were obtained either from the figures and full-text reporting or from the Gene Expression Omnibus (GEO) at GSE102924, GSE114907 and GSE234128. The processed differential expression tables and all the codes used for the analyses are available at <https://github.com/iza-mcac/2025-09-Systematic-Zikv-Glio>.

Acknowledgments: The differential expression and the pathway analysis was performed on the Gloriosos clusters, at Laboratory of Genetics Biochemistry UFMG.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflicts of interest

Abbreviations

The following abbreviations are used in this manuscript:

GBM	Glioblastoma			multiforme
ZIKV	Zika			virus
DEGs	differentially	expressed		genes
WHO	World	Health	Organization	
CNS	central	nervous	system	
OVs	oncolytic			viruses
RNA-seq	RNA			sequencing
PROSPERO	International Prospective Register of Systematic Reviews			
PRISMA analysis	Preferred Reporting Items for Systematic reviews and Meta-analysis			
MOI	Multiplicity		of	Infection
RT-qPCR	Polymerase	Chain		Reaction
HGNC	HUGO	Gene	Nomenclature	Committee
DE	differential			expression
GO:BP	Gene	Ontology	Biological	Process
NES	normalized		enrichment	score
HR	highly			refractory
MR	moderately			refractory
WT	wild-type			
NTSCs	nuclear	transfer	stem	cells
RoB	Risk		of	Bias
NF	non-infected			
GSEA	gene	set	enrichment	analysis

PAMPs	pathogen-associated	molecular	patterns
DAMPs	damage-associated	molecular patterns	

References

- Louis, D. N.; Perry, A.; Wesseling, P.; Brat, D. J.; Cree, I. A.; Figarella-Branger, D.; Hawkins, C.; Ng, H. K.; Pfister, S. M.; Reifenberger, G.; et al. The 2021 WHO Classification of Tumors of the Central Nervous System: A Summary. *Neuro-Oncology* **2021**, 23 (8), 1231–1251. <https://doi.org/10.1093/neuonc/noab106>.
- Ostrom, Q. T.; Gittleman, H.; Fulop, J.; Liu, M.; Blanda, R.; Kromer, C.; Wolinsky, Y.; Kruchko, C.; Barnholtz-Sloan, J. S. CBTRUS Statistical Report: Primary Brain and Central Nervous System Tumors Diagnosed in the United States in 2008–2012. *Neuro Oncol* **2015**, 17 (suppl 4), iv1–iv62. <https://doi.org/10.1093/neuonc/nov189>.
- Wen, P. Y.; Kesari, S. Malignant Gliomas in Adults. *N Engl J Med* **2008**, 359 (5), 492–507. <https://doi.org/10.1056/nejmra0708126>.
- Wen, P. Y.; Schiff, D.; Kesari, S.; Drappatz, J.; Gigas, D. C.; Doherty, L. Medical Management of Patients with Brain Tumors. *J Neurooncol* **2006**, 80 (3), 313–332. <https://doi.org/10.1007/s11060-006-9193-2>.
- Sanmamed, M. F.; Chen, L. A Paradigm Shift in Cancer Immunotherapy: From Enhancement to Normalization. *Cell* **2018**, 175 (2), 313–326. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2018.09.035>.
- Kaufman, H. L.; Kohlhapp, F. J.; Zloza, A. Oncolytic Viruses: A New Class of Immunotherapy Drugs. *Nat Rev Drug Discov* **2015**, 14 (9), 642–662. <https://doi.org/10.1038/nrd4663>.
- Hamad, A.; Yusubalieva, G. M.; Baklaushev, V. P.; Chumakov, P. M.; Lipatova, A. V. Recent Developments in Glioblastoma Therapy: Oncolytic Viruses and Emerging Future Strategies. *Viruses* **2023**, 15 (2), 547. <https://doi.org/10.3390/v15020547>.
- Zanluca, C.; Melo, V. C. A. de; Mosimann, A. L. P.; Santos, G. I. V. dos; Santos, C. N. D. dos; Luz, K. First Report of Autochthonous Transmission of Zika Virus in Brazil. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* **2015**, 110 (4), 569–572. <https://doi.org/10.1590/0074-02760150192>.
- Zhu, Z.; Gorman, M. J.; McKenzie, L. D.; Chai, J. N.; Hubert, C. G.; Prager, B. C.; Fernandez, E.; Richner, J. M.; Zhang, R.; Shan, C.; Tycksen, E.; et al. Zika Virus Has Oncolytic Activity against Glioblastoma Stem Cells. *Journal of Experimental Medicine* **2017**, 214 (10), 2843–2857. <https://doi.org/10.1084/jem.20171093>.
- Zhu, Z.; Mesci, P.; Bernatchez, J. A.; Gimple, R. C.; Wang, X.; Schafer, S. T.; Wettersten, H. I.; Beck, S.; Clark, A. E.; Wu, Q.; et al. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin Avβ5 Axis. *Cell Stem Cell* **2020**, 26 (2), 187–204.e10. <https://doi.org/10.1016/j.stem.2019.11.016>.
- Kao, Y.-T.; Wang, H.-I.; Shie, C.-T.; Lin, C.-F.; Lai, M. M. C.; Yu, C.-Y. Zika Virus Cleaves GSDMD to Disseminate Prognosticable and Controllable Oncolysis in a Human Glioblastoma Cell Model. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2023**, 28, 104–117. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.12.008>.
- Xu, M.-M.; Wu, B.; Huang, G.-G.; Feng, C.-L.; Wang, X.-H.; Wang, H.-Y.; Wu, Y.-W.; Tang, W. Hemin Protects against Zika Virus Infection by Disrupting Virus-Endosome Fusion. *Antiviral Research* **2022**, 203, 105347. <https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2022.105347>.
- Nair, S.; Mazzocchi, L.; Jash, A.; Govero, J.; Bais, S. S.; Hu, T.; Fontes-Garfias, C. R.; Shan, C.; Okada, H.; Shrestha, S.; et al. Zika Virus Oncolytic Activity Requires CD8+ T Cells and Is Boosted by Immune Checkpoint Blockade. *JCI Insight* **2021**, 6 (1). <https://doi.org/10.1172/jci.insight.144619>.
- Moher, D.; Liberati, A.; Tetzlaff, J.; Altman, D. G. Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. *PLoS Med* **2009**, 6 (7), e1000097. <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.1000097>.
- Seal, R. L.; Braschi, B.; Gray, K.; Jones, T. E. M.; Tweedie, S.; Haim-Vilmsky, L.; Bruford, E. A. Genenames.Org: The HGNC Resources in 2023. *Nucleic Acids Research* **2022**, 51 (D1), D1003–D1009. <https://doi.org/10.1093/nar/gkac888>.
- Yates, A. D.; Achuthan, P.; Akanni, W.; Allen, J.; Allen, J.; Alvarez-Jarreta, J.; Amode, M. R.; Armean, I. M.; Azov, A. G.; Bennett, R.; et al. Ensembl 2020. *Nucleic Acids Research* **2019**. <https://doi.org/10.1093/nar/gkz966>.

17. Sayers, E. W.; Bolton, E. E.; Brister, J. R.; Canese, K.; Chan, J.; Comeau, D. C.; Connor, R.; Funk, K.; Kelly, C.; Kim, S.; et al. Database Resources of the National Center for Biotechnology Information. *Nucleic Acids Research* **2021**, 50 (D1), D20–D26. <https://doi.org/10.1093/nar/gkab1112>.
18. R Core Team. R: A Language and Environment for Statistical Computing. Version 4.4.1. Vienna, Austria: *R Foundation for Statistical Computing*. **2024**. <https://www.r-project.org/>. Accessed September 15, 2025.
19. Wickham, H.; Bryan, J. readxl: Read Excel Files. *R package version 1.4.3*. **2023**. <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>. Accessed September 15, 2025.
20. Wickham, H.; François, R.; Henry, L.; Müller, K.; Vaughan, D. dplyr: A Grammar of Data Manipulation. *R package version 1.1.2*. **2023**. <https://CRAN.R-project.org/package=dplyr>. Accessed September 15, 2025.
21. Wickham, H.; Averick, M.; Bryan, J.; Chang, W.; McGowan, L.; François, R.; Grolemund, G.; Hayes, A.; Henry, L.; Hester, J.; et al. Welcome to the Tidyverse. *JOSS* **2019**, 4 (43), 1686. <https://doi.org/10.21105/joss.01686>.
22. Chen, H. VennDiagram: Generate High-Resolution Venn and Euler Plots. *R package version 1.7.3*. **2022**. <https://CRAN.R-project.org/package=VennDiagram>. Accessed September 15, 2025.
23. Urbanek, S. png: Read and write PNG images. *R package version 0.1-8*. **2022**. <https://CRAN.R-project.org/package=png>. Accessed September 15, 2025.
24. Yu, G. ggplotify: Convert Plot to 'grob' or 'ggplot' Object. *R package version 0.1.2*. **2023**. <https://CRAN.R-project.org/package=ggplotify>. Accessed October 16, 2025.
25. Kassambara, A. ggpubr: 'ggplot2' Based Publication Ready Plots. *R package version 0.6.0*. **2023**. <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>. Accessed October 16, 2025.
26. Schneider, K.; Schwarz, M.; Burkholder, I.; Kopp-Schneider, A.; Edler, L.; Kinsner-Ovaskainen, A.; Hartung, T.; Hoffmann, S. "ToxRTool", a New Tool to Assess the Reliability of Toxicological Data. *Toxicology Letters* **2009**, 189 (2), 138–144. <https://doi.org/10.1016/j.toxlet.2009.05.013>.
27. Klimisch, H.-J.; Andreae, M.; Tillmann, U. A Systematic Approach for Evaluating the Quality of Experimental Toxicological and Ecotoxicological Data. *Regulatory Toxicology and Pharmacology* **1997**, 25 (1), 1–5. <https://doi.org/10.1006/rtp.1996.1076>.
28. Hooijmans, C. R.; Rovers, M. M.; de Vries, R. B.; Leenaars, M.; Ritskes-Hoitinga, M.; Langendam, M. W. SYRCLE's Risk of Bias Tool for Animal Studies. *BMC Med Res Methodol* **2014**, 14 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2288-14-43>.
29. Korotkevich, G.; Sukhov, V.; Budin, N.; Shpak, B.; Artyomov, M. N.; Sergushichev, A. *Fast Gene Set Enrichment Analysis*. **2016**. <https://doi.org/10.1101/060012>.
30. Love, M. I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. *Genome Biol* **2014**, 15 (12). <https://doi.org/10.1186/s13059-014-0550-8>.
31. Smedley, D.; Haider, S.; Ballester, B.; Holland, R.; London, D.; Thorisson, G.; Kasprzyk, A. BioMart – Biological Queries Made Easy. *BMC Genomics* **2009**, 10 (1). <https://doi.org/10.1186/1471-2164-10-22>.
32. Liberzon, A.; Birger, C.; Thorvaldsdóttir, H.; Ghandi, M.; Mesirov, J. P.; Tamayo, P. The Molecular Signatures Database Hallmark Gene Set Collection. *Cell Systems* **2015**, 1 (6), 417–425. <https://doi.org/10.1016/j.cels.2015.12.004>.
33. Wickham, H. ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis. *Springer-Verlag New York*. **2016**. <https://ggplot2.tidyverse.org>. Accessed September 15, 2025.
34. Bulstrode, H.; Girdler, G. C.; Gracia, T.; Aivazidis, A.; Moutsopoulos, I.; Young, A. M. H.; Hancock, J.; He, X.; Ridley, K.; Xu, Z.; et al. Myeloid Cell Interferon Secretion Restricts Zika Flavivirus Infection of Developing and Malignant Human Neural Progenitor Cells. *Neuron* **2022**, 110 (23), 3936–3951.e10. <https://doi.org/10.1016/j.neuron.2022.09.002>.
35. Chen, Q.; Wu, J.; Ye, Q.; Ma, F.; Zhu, Q.; Wu, Y.; Shan, C.; Xie, X.; Li, D.; Zhan, X.; et al. Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate. *mBio* **2018**, 9 (5). <https://doi.org/10.1128/mbio.01683-18>.
36. Chen, L.; Zhou, C.; Chen, Q.; Shang, J.; Liu, Z.; Guo, Y.; Li, C.; Wang, H.; Ye, Q.; Li, X.; et al. Oncolytic Zika Virus Promotes Intratumoral T Cell Infiltration and Improves Immunotherapy Efficacy in Glioblastoma. *Molecular Therapy - Oncolytics* **2022**, 24, 522–534. <https://doi.org/10.1016/j.omto.2022.01.011>.

37. Chen, Q.; Li, N.; Zeng, S.; Wu, S.; Luo, X.; Zhang, S.; Zhu, L.; Wu, J.; Xie, T.; Bai, S.; et al. ZIKV Infection Differentially Affects the Transcriptional Profiles in HTR8 and U251 Cells. *Virus Research* **2023**, *334*, 199166. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2023.199166>.
38. Zhang, F.; Wang, H.-J.; Wang, Q.; Liu, Z.-Y.; Yuan, L.; Huang, X.-Y.; Li, G.; Ye, Q.; Yang, H.; Shi, L.; et al. American Strain of Zika Virus Causes More Severe Microcephaly Than an Old Asian Strain in Neonatal Mice. *EBioMedicine* **2017**, *25*, 95–105. <https://doi.org/10.1016/j.ebiom.2017.10.019>.
39. Bernardo-Menezes, L. C.; Agrelli, A.; Oliveira, A. S. L. E. de; Moura, R. R. de; Crovella, S.; Brandão, L. A. C. An Overview of Zika Virus Genotypes and Their Infectivity. *Rev. Soc. Bras. Med. Trop.* **2022**, *55*. <https://doi.org/10.1590/0037-8682-0263-2022>.
40. Liu, Y.; Zhou, J.; White, K. P. RNA-Seq Differential Expression Studies: More Sequence or More Replication? *Bioinformatics* **2013**, *30* (3), 301–304. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btt688>.
41. Williams, A. G.; Thomas, S.; Wyman, S. K.; Holloway, A. K. RNA-SEQ Data: Challenges in and recommendations for experimental design and analysis. *Current Protocols in Human Genetics*. **2014**, *83* (1), 11.13.1–20. <https://doi.org/10.1002/0471142905.hg1113s83>.
42. Errington, T. M.; Denis, A.; Perfito, N.; Iorns, E.; Nosek, B. A. Challenges for assessing replicability in preclinical cancer biology. *eLife* **2021**, *10*. <https://doi.org/10.7554/elife.67995>.
43. Kurisu, J.; Honma, A.; Miyajima, H.; Kondo, S.; Okumura, M.; Imaizumi, K. MDG1/ERdj4, an ER-resident DnaJ Family Member, Suppresses Cell Death Induced by ER Stress. *Genes to Cells* **2003**, *8* (2), 189–202. <https://doi.org/10.1046/j.1365-2443.2003.00625.x>.
44. Sun, D.; Cui, H.; Rong, L.; Ma, T.; Li, X.; Ye, Z.; Li, Z. Sestrin2 Protects Human Lens Epithelial Cells (HLECs) Against Apoptosis in Cataracts Formation: Interaction Between Endoplasmic Reticulum (ER) Stress and Oxidative Stress (OS) Is Involved. *Current Eye Research* **2024**, *49* (9), 949–960. <https://doi.org/10.1080/02713683.2024.2352058>.
45. Magg, V.; Manetto, A.; Kopp, K.; Wu, C. C.; Naghizadeh, M.; Lindner, D.; Eke, L.; Welsch, J.; Kallenberger, S. M.; Schott, J.; et al. Turnover of PPP1R15A mRNA Encoding GADD34 Controls Responsiveness and Adaptation to Cellular Stress. *Cell Reports* **2024**, *43* (4), 114069. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2024.114069>.
46. Inoue, M.; Uchida, Y.; Edagawa, M.; Hirata, M.; Mitamura, J.; Miyamoto, D.; Taketani, K.; Sekine, S.; Kawauchi, J.; Kitajima, S. The Stress Response Gene ATF3 Is a Direct Target of the Wnt/ β -Catenin Pathway and Inhibits the Invasion and Migration of HCT116 Human Colorectal Cancer Cells. *PLoS ONE* **2018**, *13* (7), e0194160. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0194160>.
47. Blum, A.; Mostow, K.; Jackett, K.; Kelty, E.; Dakpa, T.; Ryan, C.; Hagos, E. KLF4 Regulates Metabolic Homeostasis in Response to Stress. *Cells* **2021**, *10* (4), 830. <https://doi.org/10.3390/cells10040830>.
48. Thomsen, E. A.; Andersen, S.; Marqvorsen, M. H. S.; Skipper, K. A.; Paludan, S. R.; Mikkelsen, J. G. Single-Cell Monitoring of Activated Innate Immune Signaling by a d2eGFP-Based Reporter Mimicking Time-Restricted Activation of IFNB1 Expression. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2022**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.784762>.
49. Ramos, I.; Smith, G.; Ruf-Zamojski, F.; Martínez-Romero, C.; Fribourg, M.; Carbajal, E. A.; Hartmann, B. M.; Nair, V. D.; Marjanovic, N.; Monteagudo, P. L.; et al. Innate Immune Response to Influenza Virus at Single-Cell Resolution in Human Epithelial Cells Revealed Paracrine Induction of Interferon Lambda 1. *J Virol* **2019**, *93* (20). <https://doi.org/10.1128/jvi.00559-19>.
50. Zhang, B.; Goraya, M. U.; Chen, N.; Xu, L.; Hong, Y.; Zhu, M.; Chen, J.-L. Zinc Finger CCCH-Type Antiviral Protein 1 Restricts the Viral Replication by Positively Regulating Type I Interferon Response. *Front. Microbiol.* **2020**, *11*. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2020.01912>.
51. Zhu, J.; Ghosh, A.; Sarkar, S. N. OASL—a New Player in Controlling Antiviral Innate Immunity. *Current Opinion in Virology* **2015**, *12*, 15–19. <https://doi.org/10.1016/j.coviro.2015.01.010>.
52. Li, M.; Sun, X.; Zhao, J.; Xia, L.; Li, J.; Xu, M.; Wang, B.; Guo, H.; Yu, C.; Gao, Y.; et al. CCL5 Deficiency Promotes Liver Repair by Improving Inflammation Resolution and Liver Regeneration through M2 Macrophage Polarization. *Cell Mol Immunol* **2019**, *17* (7), 753–764. <https://doi.org/10.1038/s41423-019-0279-0>.
53. Mangold, C. A.; Rathbun, M. M.; Renner, D. W.; Kuny, C. V.; Szpara, M. L. Viral Infection of Human Neurons Triggers Strain-Specific Differences in Host Neuronal and Viral Transcriptomes. *PLoS Pathog* **2021**, *17* (3), e1009441. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1009441>.

54. Xu, C.; Hou, P.; Li, X.; Xiao, M.; Zhang, Z.; Li, Z.; Xu, J.; Liu, G.; Tan, Y.; Fang, C. Comprehensive Understanding of Glioblastoma Molecular Phenotypes: Classification, Characteristics, and Transition. *Cancer Biol Med* **2024**, 1–19. <https://doi.org/10.20892/j.issn.2095-3941.2023.0510>.
55. Liang, L.; Weng, J.; You, Y.; He, Q.; Fan, Y.; Liao, G. Role of Noxa in Proliferation, Apoptosis, and Autophagy in Human Adenoid Cystic Carcinoma. *J Oral Pathology Medicine* **2018**, 48 (1), 52–59. <https://doi.org/10.1111/jop.12787>.
56. Szabo, L.; Morey, R.; Palpant, N. J.; Wang, P. L.; Afari, N.; Jiang, C.; Parast, M. M.; Murry, C. E.; Laurent, L. C.; Salzman, J. Statistically Based Splicing Detection Reveals Neural Enrichment and Tissue-Specific Induction of Circular RNA during Human Fetal Development. *Genome Biol* **2015**, 16 (1). <https://doi.org/10.1186/s13059-015-0690-5>.
57. Focosi, D.; Maggi, F.; Pistello, M. Zika Virus: Implications for Public Health. *Clin Infect Dis.* **2016**, 63 (2), 227–233. <https://doi.org/10.1093/cid/ciw210>.
58. Geddes, V. E. V.; Brustolini, O. J. B.; Cavalcante, L. T. de F.; Moreira, F. R. R.; de Castro, F. L.; Guimarães, A. P. de C.; Gerber, A. L.; Figueiredo, C. M.; Diniz, L. P.; Neto, E. de A.; et al. Common Dysregulation of Innate Immunity Pathways in Human Primary Astrocytes Infected With Chikungunya, Mayaro, Oropouche, and Zika Viruses. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* **2021**, 11. <https://doi.org/10.3389/fcimb.2021.641261>.
59. Marelli, G.; Howells, A.; Lemoine, N. R.; Wang, Y. Oncolytic Viral Therapy and the Immune System: A Double-Edged Sword Against Cancer. *Front. Immunol.* **2018**, 9. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2018.00866>.

Disclaimer/Publisher’s Note: The statements, opinions and data contained in all publications are solely those of the individual author(s) and contributor(s) and not of MDPI and/or the editor(s). MDPI and/or the editor(s) disclaim responsibility for any injury to people or property resulting from any ideas, methods, instructions or products referred to in the content.

5. Capítulo 2.

Neste capítulo, analisamos o transcriptoma e o epitranscriptoma da linhagem U-87MG de GBM infectada pela cepa PE243 do ZIKV. Além de reproduzir um desenho experimental previamente descrito aplicados aqui a modelos virais e celulares ainda não explorados, buscamos caracterizar pela primeira vez as modificações epitranscriptômicas induzidas pela infecção em transcritos de células de GBM. Para isso, utilizamos sequenciamento direto de RNA (Oxford Nanopore), tecnologia que, até onde sabemos, ainda não havia sido aplicada ao estudo do ZIKV. A metodologia das etapas de bancada realizados neste capítulo está descrita em detalhes no Anexo I. Nossos resultados revelaram 21 DEGs e 1.302 transcritos diferencialmente expressos, indicando que a regulação em nível de isoformas desempenha papel substancial neste processo infeccioso. Identificamos também mais de 2.000 modificações epitranscriptômicas diferencialmente enriquecidas em células infectadas, incluindo m⁶A, m⁵C, pseU e I. Os achados descritos neste capítulo representam resultados preliminares do projeto, com caráter predominantemente descritivo e quantitativo. Ressalta-se que há ainda um conjunto substancial de análises e interpretações possíveis a partir dos dados obtidos que não foram incluídas nesta tese a fim de não extrapolar o prazo regulamentar da defesa. Após a conclusão das análises bioinformáticas adicionais, incluindo a anotação do contexto genômico dos sítios modificados, a identificação de motivos compatíveis com enzimas modificadoras, a avaliação de co-localização com proteínas leitoras e a validação funcional em células U-87MG por meio do knockout de METTL3, o manuscrito será atualizado e posteriormente submetido para publicação em periódico indexado.

Zika virus infection shapes the transcriptomic and epitranscriptomic landscape in glioblastoma

Izabela Mamede^{1,2*}, Diego Menezes^{3*}, Clarisse Rezende Reis¹, Daniel Costa Queiroz³, Victor Emmanuel Ferreira Geddes^{2,4}, Paulo de Paiva Rosa Amaral⁵, Glória Regina Franco¹, Renato Santana Aguiar³.

1. Laboratory of Genetics Biochemistry, Department of Biochemistry and Immunology, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.
2. D'OR Institute for Research and Education, Rio de Janeiro, Brazil.
3. Laboratory of Integrative Biology, Department of Genetics, Ecology and Evolution, ICB, UFMG, Belo Horizonte, Brazil.
4. IDOR Pioneer Science Initiative, Rio de Janeiro, Brazil.
5. Insper.

* These authors contributed equally to this work.

Abstract

Zika virus (ZIKV) exhibits selective cytotoxicity toward glioblastoma (GBM) cells, yet the molecular basis of this oncolytic activity remains poorly understood. While previous studies have profiled transcriptional responses to ZIKV infection in GBM models, none have examined the accompanying RNA epigenetic remodeling, an essential regulatory layer in both tumor biology and antiviral defense. We integrated short-read (Illumina) and long-read direct RNA sequencing (Oxford Nanopore) to characterize, for the first time, the combined transcriptomic and epitranscriptomic landscape of ZIKV-infected U-87MG GBM cells. Differential gene, isoform, and RNA-modification analyses were performed using Salmon/DESeq2, Oarfish/Minimap2, and Modkit, with cross-platform validation of transcript-level regulation. ZIKV infection induced 21 differentially expressed genes, dominated by interferon-stimulated genes and inflammatory chemokines, but 1,302 differentially expressed transcripts, revealing extensive isoform-specific regulation. Concordant remodeling of isoforms associated with translation, proteostasis, cytoskeleton organization, and mitochondrial function was observed across sequencing platforms. Epitranscriptomic profiling detected over 2,000 RNA modifications: N6-methyladenosine (m⁶A), N5-methylcytosine (m⁵C), pseudouridine (pseU), and inosine (I), many of which were isoform-specific and co-occurred in combinatorial patterns, particularly on ribosomal and proteostasis-related transcripts (*RPLP0*, *RPLP1*, *RPL8*, *SERF2*). These signatures indicate coordinated remodeling of RNA stability, splicing, and translational control. Additionally, ZIKV-induced modulation of key translational machinery suggests

potential engagement of host shutoff pathways that may enhance tumor-selective vulnerability. ZIKV elicits a multilayered regulatory response in GBM cells, coupling canonical antiviral signaling with profound isoform restructuring and coordinated RNA-modification reprogramming. By integrating short- and long-read sequencing, this study uncovers previously unrecognized molecular vulnerabilities and provides a mechanistic framework that advances the understanding of ZIKV's oncolytic potential. These findings lay the groundwork for future studies exploring epitranscriptomic and isoform-level mechanisms as therapeutic targets in GBM.

Introduction

Zika virus (ZIKV) is a positive-sense single-stranded RNA flavivirus (Flaviviridae), first isolated in Uganda in 1947 (DICK & KITCHEN, 1952). As an arbovirus, the mosquito-borne transmission of ZIKV remained confined to Africa and Southeast Asia for decades, with sporadic outbreaks correlated with local rain cycles (JAVED et al., 2018). The introduction of ZIKV into the Americas during the 2014 FIFA World Cup in Brazil (ZANLUCA et al., 2015) drew significant attention from the scientific community, mainly due to the emergence of Congenital Zika Syndrome, a clinical condition culminating in fetal microcephaly among other symptoms, occurring in up to 15% of infected pregnant women (DE OLIVEIRA MELO et al., 2016). Contemporary studies associated the severity of fetal symptoms with the virus's tropism for proliferative neuroglial cells (MOORE et al., 2017). The strong cytopathic effect observed in this tissue led researchers to hypothesize a potential oncolytic effect against glioblastoma (GBM), an extremely aggressive tumor that originates from astrocyte differentiation (LOUIS et al., 2021). Compelling evidence supporting this hypothesis was provided by Zhu and colleagues, who demonstrated that ZIKV infection impaired tumor growth in three GBM cell lines without collateral damage to healthy cells (ZHU et al., 2017).

The study of newly discovered effects, such as ZIKV-induced cytopathicity in GBMs, calls for research strategies that take a broad, discovery-oriented perspective. Rather than constraining analyses to preselected genes or pathways, these comprehensive methods survey the full spectrum of transcriptional changes, increasing the likelihood of identifying unexpected mechanisms or novel molecular players. To date, five studies have assessed the transcriptome of ZIKV strains infecting GBM models (BULSTRODE et al., 2022; CHEN et al., 2018; CHEN et al., 2022; CHEN et al., 2023; ZHU et al., 2017). While these works provide valuable information addressing the pathways activated by this infection, none aimed to characterize the

epigenetic modifications that follow ZIKV interaction with tumor cells. RNA epigenetic marks constitute a dynamic post-transcriptional regulatory layer that shapes RNA stability, translation, splicing, and cellular stress responses (ROUNDTREE et al., 2017; MEYER & JAFFREY, 2014). These modifications are installed, removed, and interpreted by coordinated enzymatic systems such as METTL3/METTL14, NSUN methyltransferases, pseU-synthases, ADAR deaminases, FTO/ALKBH5 demethylases, and YTH-domain readers, all of which modulate transcript fate in health and disease (LIU et al., 2013; HUSSAIN et al., 2013; CARLILE et al., 2019; WALKLEY & LI, 2017; ZHENG et al., 2012; WANG et al., 2013). Importantly, these marks play key roles both in malignant transformation, by shaping plasticity, proteostasis, and stemness programs, and in host responses to viral infection, where flaviviruses can reprogram host RNA modifications and alter the marking of their own genomes. These regulatory signatures, including RNA editing and m⁶A marking, represent an important layer of gene regulation, known to be exploited by flaviviruses during viral entry and replication (WALES-MCGRATH et al., 2023; GOKHALE et al., 2016).

The Direct RNA Sequencing methodology (Oxford Nanopore) enables the characterization of several components of this regulatory layer, including RNA modifications such as m⁶A, m⁵C, pseU, and A→I editing. In this study, the transcriptomic and epitranscriptomic profiles of the ZIKV-infected GBM cell line U-87 MG were characterized using a combination of short- and long-read RNA sequencing (RNA-seq) approaches. In total, four types of chemical marks: m⁶A, m⁵C, I, and pseU were detected in both viral and host RNA, with m⁶A being the most abundant. Collectively, these findings shed light on how ZIKV reshapes RNA processing, helping to elucidate its oncolytic potential against GBM cells.

Methods

Cell lines, virus and culture conditions

The human GBM cell line U-87MG (ATCC® HTB-14™) and the African green monkey kidney cell line Vero (ATCC® CCL-81™) were obtained from the American Type Culture Collection (ATCC). The Zika virus strain ZIKV PE/243, originally isolated from a patient in Pernambuco, Brazil (DONALD et al., 2016), was used for infections. Cells were maintained in Corning® culture flasks (#430168) containing low-glucose Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM; Gibco, #11885-084), supplemented with 10% fetal bovine serum (FBS; Gibco, #12657-029) and 1% penicillin-streptomycin (Gibco, #15140-122). Cultures

were incubated at 37°C in a humidified atmosphere containing 5% CO₂. All cell lines were regularly tested for mycoplasma contamination and used up to passage 20. ZIKV stocks were propagated in Vero cells and titrated by standard plaque assay using the same cell line.

Determination of the Working Multiplicity of Infection (MOI)

To determine the optimal working multiplicity of infection (MOI), two parallel experiments were performed: a cell viability assay across multiple time points and MOIs, and an infectivity assay evaluated 72 hours post-infection. U-87MG cells (5×10^4 per well) were seeded in 96-well plates and infected 24 hours later with ZIKV at MOIs of 0.001, 0.036, 0.073, and 0.363, alongside mock controls. Following infection, viral supernatants were removed and replaced with maintenance medium (DMEM supplemented with 2% FBS). Viability was assessed at 0, 24, 48, and 72 hours using the CellTiter-Blue® assay (Promega), with fluorescence measured at 560-590 nm. Infectivity was determined 72 hours post-infection by immunofluorescence detection of ZIKV E protein using anti-E (Arigo biolaboratories # ARG66286; 1:500) primary and Alexa Fluor 488-conjugated secondary antibodies (Invitrogen #A21202; 1:1000), with DAPI nuclear counterstaining. The proportion of infected cells was quantified across ten randomly selected microscopic fields per MOI, normalized by control non infected cells. Together, these data allowed the selection of the working MOI that provided a balance between sufficient infection efficiency (>75%) and acceptable cell viability for subsequent transcriptomic experiments.

Plating and infection

To assess the transcriptomic profile of ZIKV-infected GBM cells, U-87MG cells were seeded into two 6-well plates (Corning® #3516) at a density of 1.875×10^5 cells/mL in 2 mL of the previously described medium, 24 hours prior to infection. One plate was assigned to the infected group and the other to the uninfected control (mock), each comprising six biological replicates. To validate the chosen multiplicity of infection (MOI), an infectivity assay was conducted in parallel under the same parameters previously described (Fig. 1). For this, cells were seeded into a black, clear-bottom 96-well plate (Corning® #3603) at a density of 1.25×10^5 cells/mL in 80 µL of medium, also 24 hours prior to infection. Infected and control groups were plated in separate columns (n = 3 per group) to minimize cross-contamination. For both assays, cells were inoculated either with ZIKV at an MOI of 0.3632 PFU/cell (infected group)

or with serum-free medium (control group). Plates were incubated for 1 hour at 37°C in a humidified 5% CO₂ atmosphere, with gentle agitation every 15 minutes to facilitate viral adsorption. Afterwards, the inoculum was removed and replaced with DMEM supplemented with 2% FBS and 1% penicillin-streptomycin. Plates were then incubated for 48 hours under the same conditions.

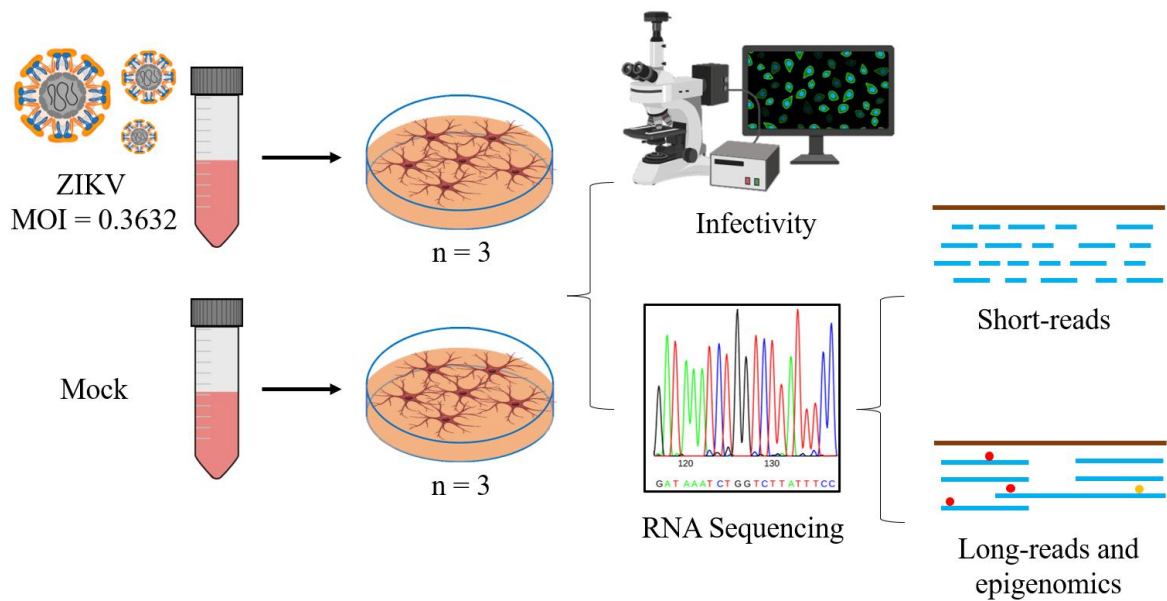


Figure 1. Experimental design of the transcriptomic profiling of ZIKV infection in GBM cells. U-87MG cells (n = 3) were inoculated either with ZIKV (MOI = 0.3632) or with mock-treated controls. Cells were then directed to two parallel assays: (i) RNA extraction followed by sequencing using short-read (Illumina) and long-read (Oxford Nanopore) platforms, the latter also enabling epitranscriptomic analyses, and (ii) immunofluorescence assays to confirm infectivity.

Library prep and RNA sequencing

The culture supernatant was discarded, and cells were detached with 300 µL of 0.25% trypsin-EDTA (Gibco #25200-056) for 3 minutes. The cell suspension was collected, centrifuged at 300×g for 5 minutes, and the supernatant was discarded. Total intracellular RNA was extracted from the resulting cell pellets using the RNeasy Kit (QIAGEN #74104), following the manufacturer's instructions. Residual genomic DNA was removed with DNase

treatment using the TURBO DNA-free™ Kit (Invitrogen #AM1907). Infection was verified in normalized RNA samples by RT-qPCR targeting ZIKV (E), with *GAPDH* and *rRNA18S5* as internal controls. RNA quality was assessed using a TapeStation 4200 (Agilent #G2991BA) with the High Sensitivity RNA ScreenTape (Agilent #5067-5579). The three samples from each group with the highest RNA Integrity Number equivalent (RINe) were selected for library preparation and sequencing. For short-read sequencing, libraries were prepared with the Illumina Stranded Total RNA Prep, Ligation with Ribo-Zero Plus Kit for ribosomal RNA depletion (Illumina #20040525) according to the manufacturer's instructions, and sequenced on the NextSeq 1000 platform (Illumina #20038898) using a P1 flow cell (Illumina #20049921) and P1 reagents cartridge (300 cycles) (Illumina #20049920). For long-read sequencing and epitranscriptomic analysis, libraries were prepared with the Direct RNA Sequencing Kit (Oxford Nanopore #SQK-RNA004) following the manufacturer's protocol, and sequenced using an R10 RNA flow cell (Oxford Nanopore #FLO-MIN004RA) on the MinION Mk1B platform (Oxford Nanopore #MIN-101B).

Isoform calling

Short-read libraries were mapped and quantified using *Salmon* (PATRO et al., 2017) followed by differential expression analysis with *DESeq2* (LOVE et al., 2014) and the *swish* function of package *fishpond* (ZHU et al., 2019). Isoform-level expression changes were explored and visualized using *Isoformic* (MAMEDE & QUEIROZ), which was also used for integration and plotting across conditions. In parallel, direct RNA sequencing libraries were prepared from the same samples. Raw nanopore signals in *.pod5* format were basecalled using *Dorado* model v1.0.1. Long-read alignments were performed with *Oarfish* (JOUSHEGHANI & PATRO, 2024) and *Minimap2* (HENG, 2018), enabling isoform-level mapping. RNA modification detection was performed using *Modkit*, and differential isoform expression was assessed with *DESeq2* (LOVE et al., 2014). *Isoformic* (MAMEDE & QUEIROZ) was further applied for the integration of long- and short-read datasets, enabling combined visualization of isoform regulation and modification profiles (Fig. 2).

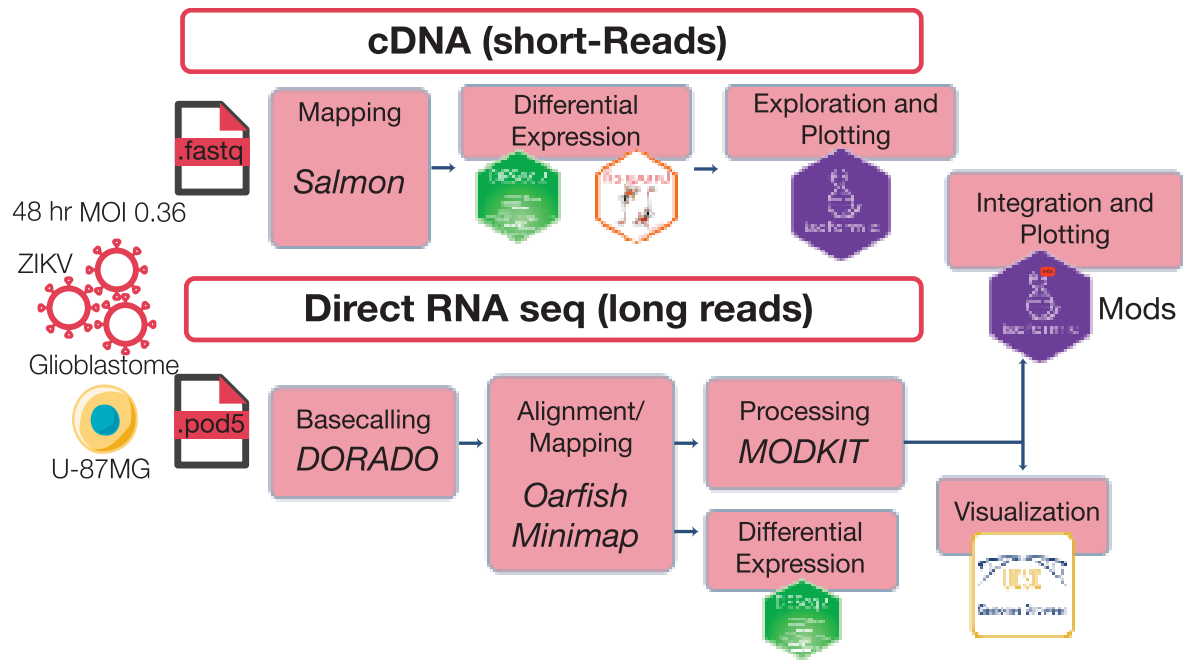


Figure 2. Workflow for isoform and RNA modification analysis. Short-read (cDNA) and long-read (direct RNA) sequencing approaches were combined to assess isoform expression and RNA modifications in ZIKV-infected U-87MG glioblastoma cells. For short reads, *Salmon* was used for mapping and quantification, followed by differential expression (*DESeq2*, *fishpond*) and isoform-level exploration with *Isoformic*. For long reads, raw nanopore data (.pod5) was basecalled with *Dorado*, aligned with *Oarfish/Minimap2*, and processed with *Modkit* for RNA modification detection. Long-read differential expression was also assessed with *DESeq2* (LOVE et al., 2014). Isoform-level integration and visualization were performed with *Isoformic* (MAMEDE & QUEIROZ) and the UCSC Genome Browser.

Results

Infectivity and viability assays

To determine the optimal multiplicity of infection (MOI), a 72-hour post-infection infectivity assay was performed. The results indicated that an MOI of 0.363 PFU/cell yielded the highest infection rate, reaching 81.58% (IQR 50–90.91%) (Fig. 3B). At this MOI, relative cell viability remained above 75% at 48 hours post-infection (Fig. 3A). Consequently, this time point was selected for the subsequent transcriptomic analysis. A second infectivity assay conducted in parallel with the transcriptomic infection (Fig. 3C) confirmed a high infection

rate, with 88.32% (IQR 77.55–90.86%) of U-87MG cells infected at an MOI of 0.363 (Fig. 3D).

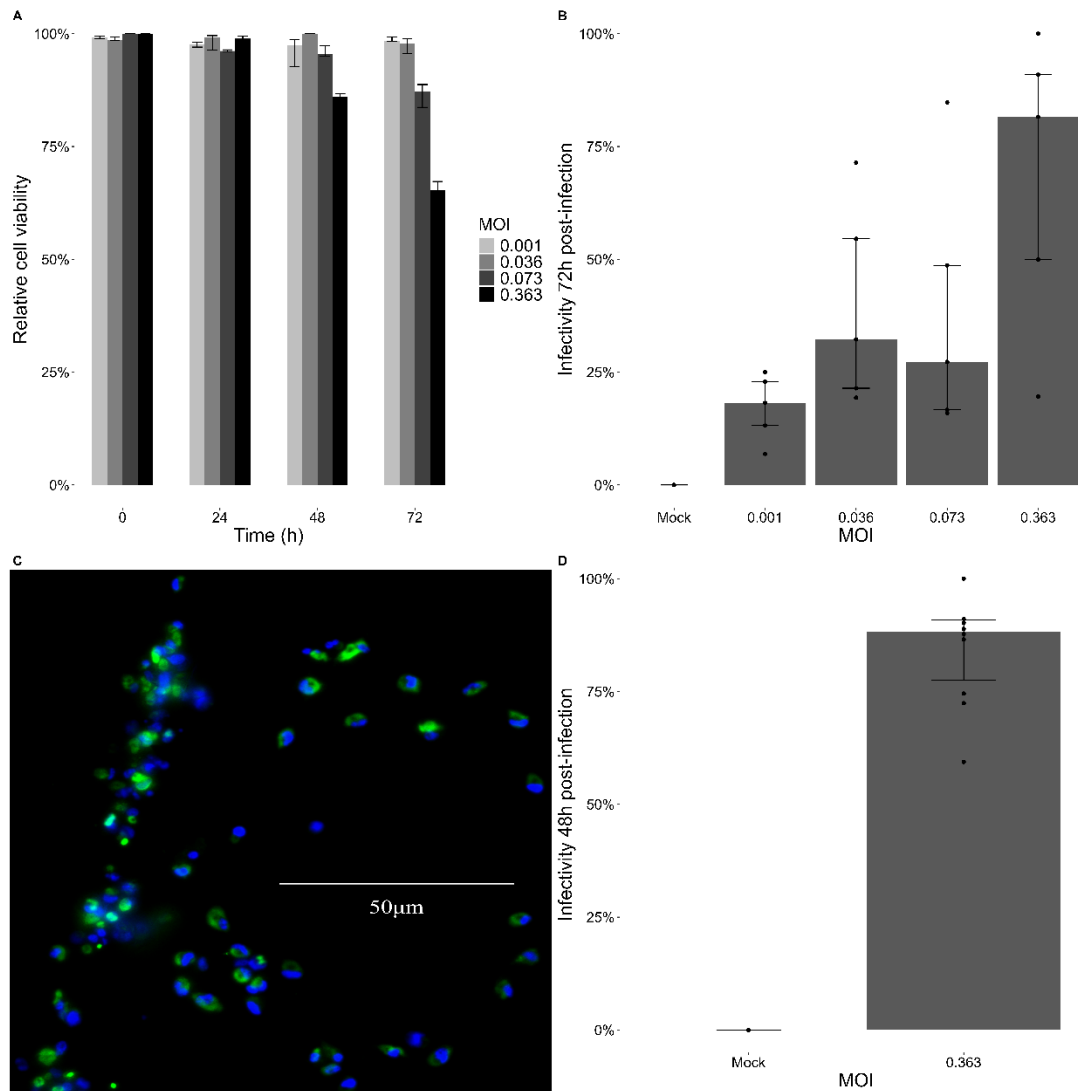


Figure 3. Determination and validation of the working MOI for ZIKV infection in U-87MG cells. (A) Relative cell viability at 0-, 24-, 48-, and 72-hours post-infection with ZIKV at four multiplicities of infection (MOI = 0.001, 0.036, 0.073, and 0.363) measured by resazurin-based assay. (B) Infectivity rates at 72 hours post-infection determined by anti-ZIKV(E) immunofluorescence staining across the same MOIs and mock controls. Bars represent the median infectivity measured across 10 imaging fields, with corresponding interquartile range (IQR) whiskers. (C) Representative fluorescence microscopy image of U-87MG cells infected at the selected working MOI (0.363) showing nuclei (blue, DAPI) and ZIKV-E-positive cells (green, Alexa Fluor 488). (D) Infectivity rate at 48 hours post-infection using the working MOI (0.3632), calculated from ten microscopic fields. Data represent median $\pm$ interquartile range from three independent replicates.

Transcript-level regulation dominates the response of U-87MG cells to ZIKV infection

To characterize the transcriptomic remodeling of GBM cells induced by ZIKV infection, we performed differential expression (DE) analysis at both gene and transcript levels using short-read RNA-seq data from infected and mock-treated U-87MG cells ($|\log_2 \text{fold change}| > 1$; $p < 0.05$). The analysis identified 21 differentially expressed genes (DEGs): *IFIT2*, *CCL5*, *RSAD2*, *CXCL10*, *OASL*, *CXCL8*, *H3C4*, *CXCL11*, *IFIT1*, *RAET1L*, *IL7R*, *CXCL1*, *IFNL1*, *H4C16*, *HLA-DOB*, *ACTN2*, *RND1*, and *EXOSC4*, as well as the non-coding RNA ENSG00000286610, all of which were upregulated, whereas only *CCDC85A* and the non-coding RNA RN7SL731P appeared downregulated (Fig. 4A, B).

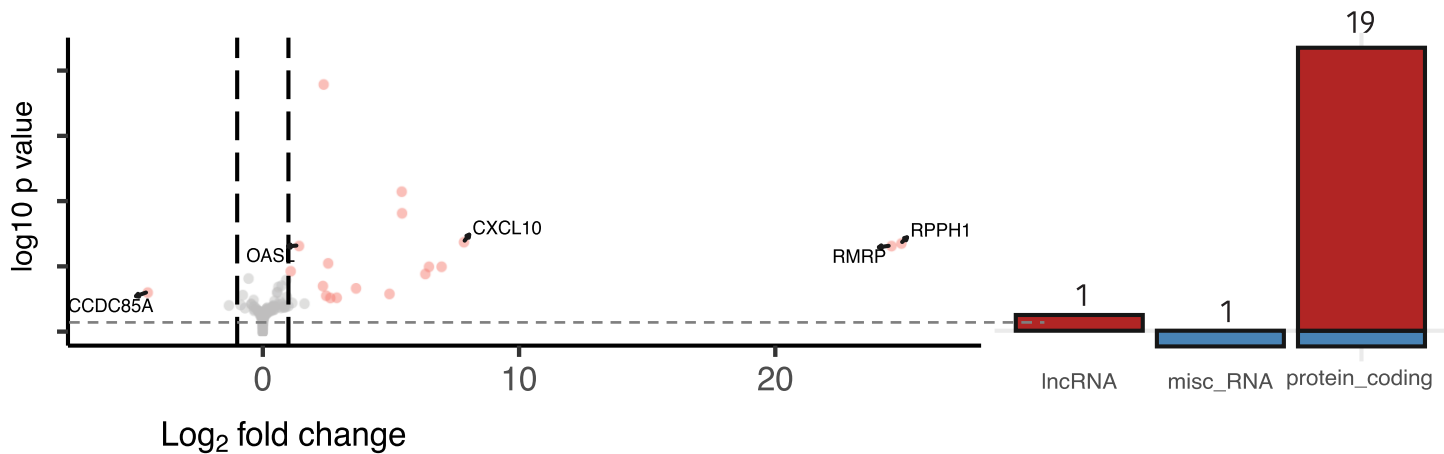


Figure 4. Differential gene expression in ZIKV-infected U-87MG cells. Volcano plot (A) display significant up- and down-regulated genes derived from short-read RNA-seq, while bar plots (B) summarize the distribution of DEGs by biotype. Points highlighted in salmon in the volcano plots pass the differential expression thresholds ($p\text{-value} < 0.05$ and $|\log_2\text{FC}| > 1$). In the bar plots, upregulated genes are shown in red and downregulated genes in blue. Numbers above each bar indicate the total count of genes.

Upregulated genes included canonical interferon-stimulated genes (*IFIT1*, *IFIT2*, *RSAD2* and *OASL*) and inflammatory chemokines (*CCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL8* and *CXCL1*), consistent with activation of antiviral and proinflammatory pathways. Concomitant induction of *IFNL1* and *HLA-DOB* further supported engagement of both innate and adaptive immune responses. Additionally, modulation of cytoskeletal and RNA-processing genes (*ACTN2*, *RND1* and *EXOSC4*) and histone variants (*H3C4* and *H4C16*) indicated broad

structural and transcriptional reorganization, whereas downregulation of *CCDC85A* suggested viral suppression of proliferation-associated programs. These results suggest that ZIKV infection elicits a coordinated antiviral response coupled to extensive transcript-level reprogramming in U-87MG cells.

Distinct isoform-level expression patterns reveal alternative stress and metabolic responses to ZIKV infection

In contrast to the small number of DEGs, 1,302 differentially expressed transcripts were detected, spanning protein-coding isoforms (619), long non-coding RNAs (lncRNAs; 56), nonsense-mediated decay (NMD) features (151), and retained-intron isoforms (158; Fig. 5A, B), indicating that regulation at the transcript (isoform) level vastly exceeds that observed at the gene level.

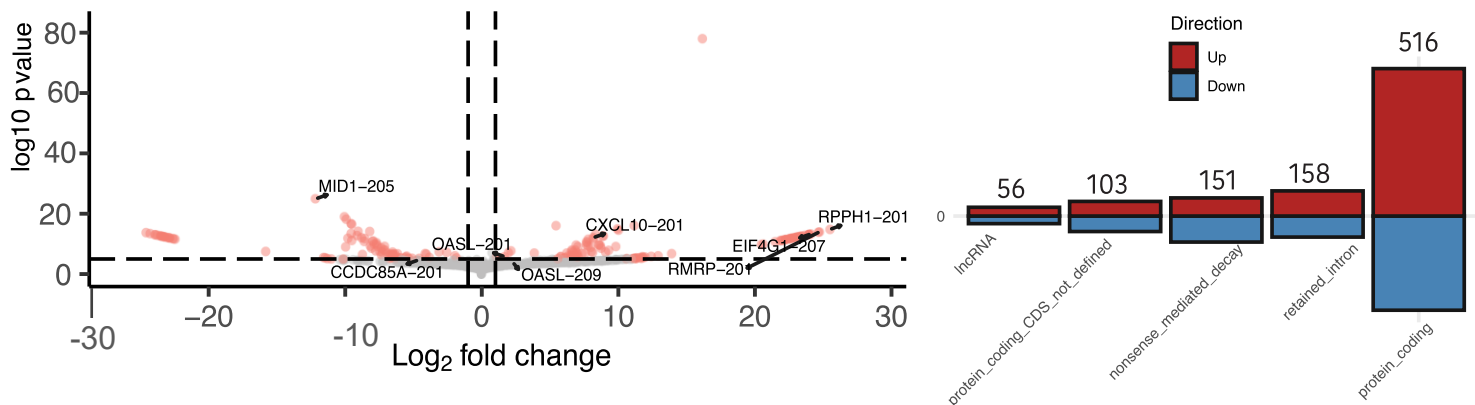


Figure 5. Differential transcript expression in ZIKV-infected U-87MG cells. Volcano plot (A) display significant up- and down-regulated isoforms derived from short-read RNA-seq, while bar plots (B) summarize the distribution of isoform by biotype. Points highlighted in salmon in the volcano plots pass the differential expression thresholds ($p\text{-value} < 0.05$ and $|\log_2FC| > 1$). In the bar plots, upregulated isoforms are shown in red and downregulated isoforms in blue. Numbers above each bar indicate the total count of transcripts.

To further assess the direct impact of splicing in short-read data we visualized the counts distribution between samples of a selected group of genes, all that had over two differentially expressed isoforms with over 2 of absolute *log₂FoldChange* (Fig. 6).

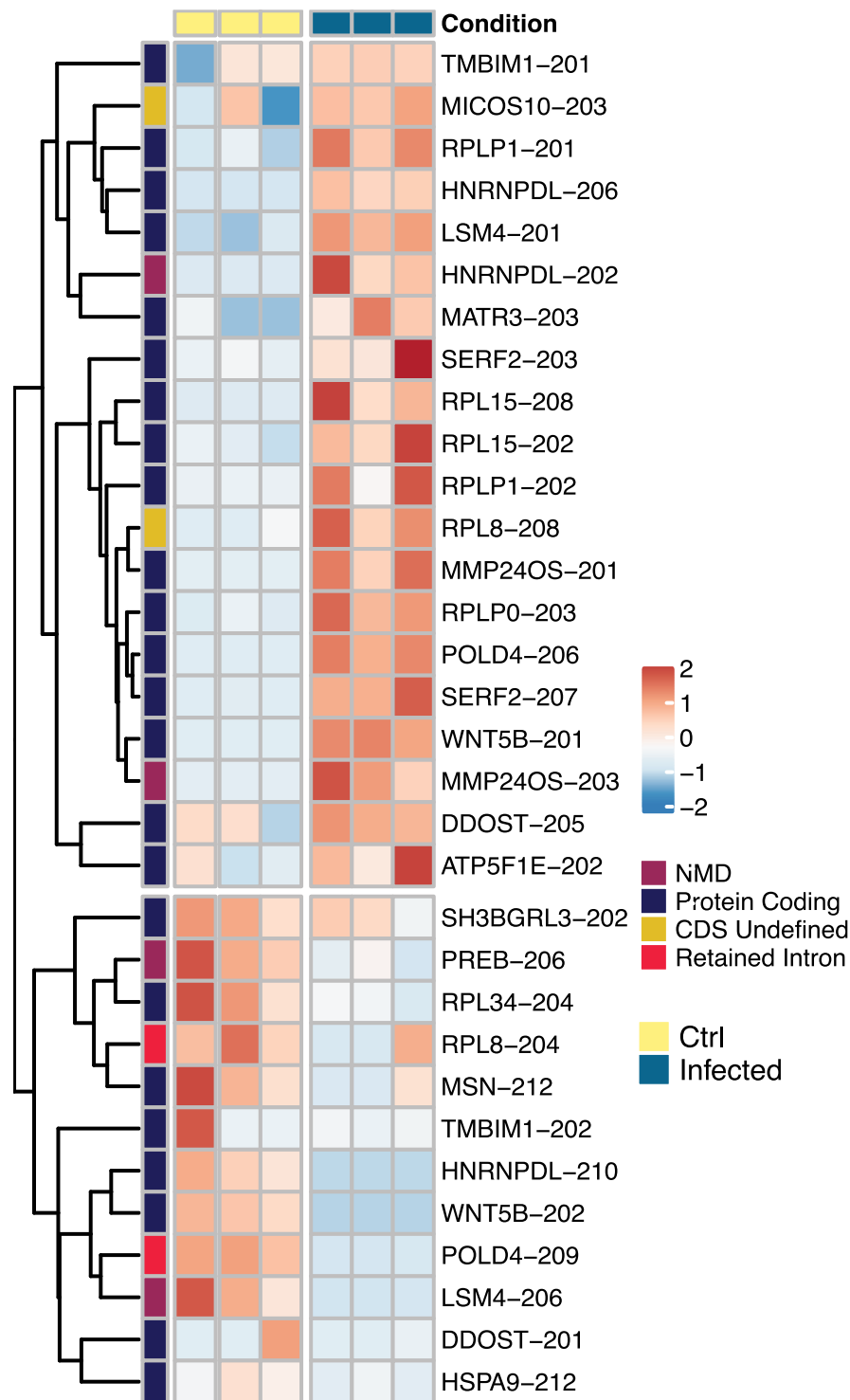


Figure 6. Heatmap of $\log_2FC > 2$ isoforms with only genes that have more than 2 isoforms DE. Rows represent isoforms, derived from short-read RNA-seq, clustered by expression pattern, and columns represent individual samples (Ctrl = yellow, Infected = blue). Expression values are shown as scaled Z-scores (red = upregulated, blue = downregulated). Isoforms are annotated by coding potential (protein-coding, CDS undefined) and by the presence of retained introns or nonsense-mediated decay (NMD) features. Isoforms labeled as 201 represent canonical transcript variants, whereas 201.x (e.g., 202, 203, etc.) denote alternative splicing derivatives that differ in their exon composition.

Multiple genes displayed concordant isoform changes: the ribosomal/translation group RPLP1 (ribosomal protein lateral stalk subunit P1; isoforms 201/202), RPL15 (large subunit protein L15; 208/202), and RPL8 (large subunit protein L8; 208/204) was consistently up-regulated. RNA processing and splicing factors were also elevated, including HNRNPDL (heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like; 202/206/210), MATR3 (Matrin-3; 203), and LSM4 (U6 snRNP Sm-like protein; 201/206). We observed modulation of DNA replication machinery via POLD4 (DNA polymerase delta subunit 4; 206/209). Mitochondrial and bioenergetic components increased in infected samples, notably MICOS10 (MICOS complex subunit; 203), ATP5F1E (ATP synthase F1 subunit ϵ ; 202), and HSPA9 (mitochondrial Hsp70; 212). ER/protein-processing and proteostasis factors were up-regulated, including DDOST (oligosaccharyltransferase subunit; 205/201) and SERF2 (small EDRK-rich factor; 203/207). Signaling, trafficking, and cytoskeletal regulators also changed, such as WNT5B (WNT signaling ligand; 201/202), MSN (moesin; 212), SH3BGR13 (adaptor/redox-responsive protein; 202), and PREB (SEC12/traffic-linked transcription factor; 206). The panel includes a noncoding antisense transcript, MMP24OS (201/203). Taken together, the response is enriched for translation, RNA-processing, mitochondrial/energy, and ER-glycosylation/proteostasis programs, rather than classical interferon-stimulated genes (no canonical interferon-stimulated genes are represented in this set).

Coordinated Isoform Remodeling upon ZIKV Infection

To validate the isoform-level remodeling observed in short-read data and to investigate whether RNA modifications contribute to this regulation, we integrated long-read transcriptome sequencing with epitranscriptomic profiling. Long-read sequencing, which provides full-length isoform resolution albeit at lower depth, was used primarily as an orthogonal confirmation rather than for de novo discovery. We assessed whether the isoforms highlighted in the short-read analysis were present in the long-read libraries and whether their direction of change was consistent across platforms (Fig. 7). Of the 1,302 isoforms differentially expressed in short reads, 389 were also significant in long-read data, whereas only one isoform appeared uniquely in the latter. This cross-validation supports that the observed remodeling reflects genuine, coordinated changes in isoform usage.

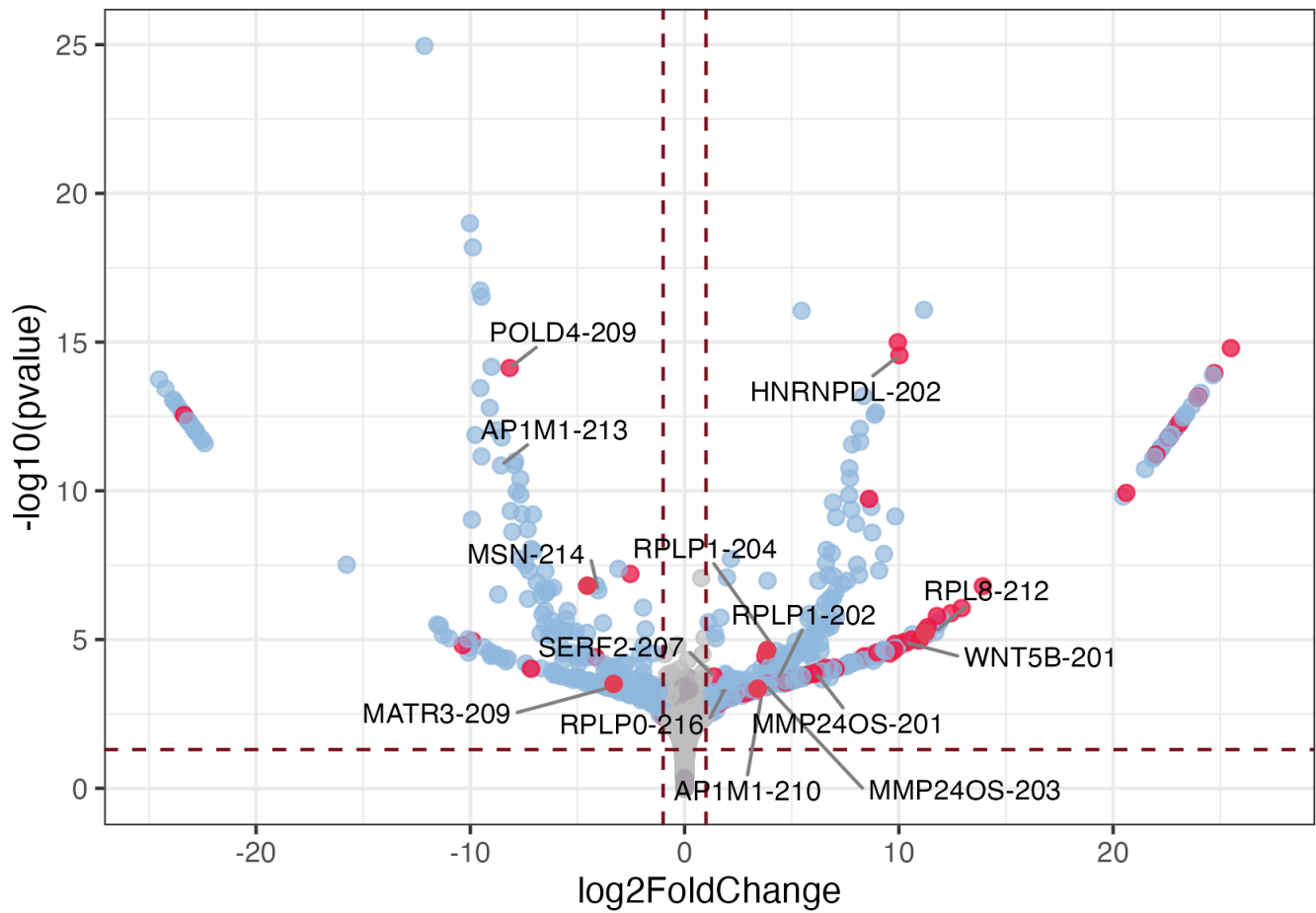


Figure 7. Differentially expressed isoforms detected across long- and short-read sequencing. Volcano plot shows isoforms detected by long-read sequencing that are also significantly differentially expressed in short-read data. Points highlighted in red represent isoforms passing the differential expression thresholds ($|\log_2 \text{fold change}| > 1$, adjusted p-value < 0.05) in both long and short reads. In blue, isoforms are only present in short reads.

Zika infection modulates the cellular RNA epitranscriptome

To integrate epitranscriptomic information, we next analyzed RNA modifications identified by Dorado (m^6A , m^5C , pseudouridine, and inosine), performing per-transcript and per-site differential analyses that combined total read counts and modification percentages. This approach enabled the detection of modification sites differentially enriched upon ZIKV infection and the definition of significance thresholds for each modification type (Fig. 8).

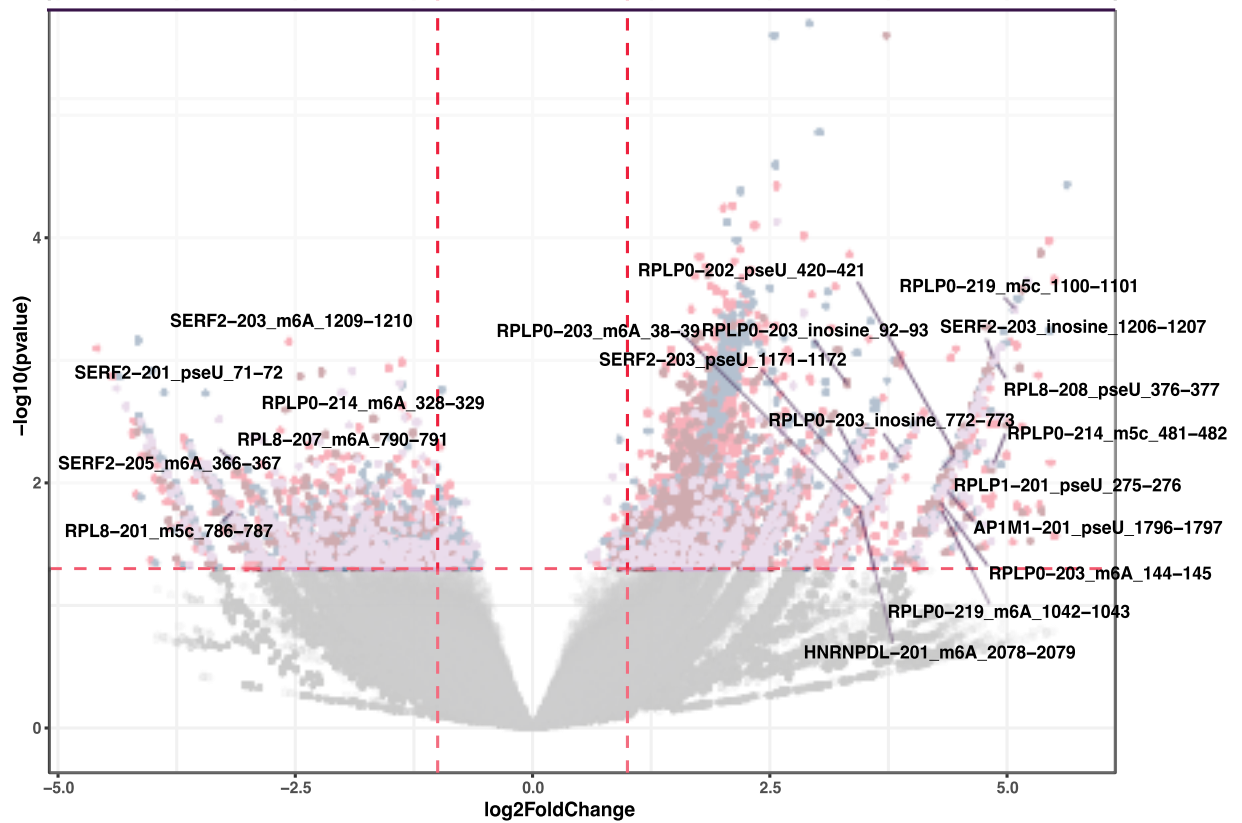


Figure 8. RNA modification dynamics in ZIKV-infected U-87MG cells. Superposed volcano plot showing differential modification presence between infected and control samples, with superposition of four modification types: N6-methyladenosine (m^6A), m^5C , pseudouridine (pseU), and inosine. Points passing differential thresholds (p -value < 0.05 and $|\log_2 \text{fold change}| > 1.5$) are highlighted and color-coded by modification type. Selected significant sites are labeled with their transcript name and modification coordinates (numbers).

The superposed volcano plot revealed clusters of multi-site, multi-mark regulation on a limited set of transcripts, most notably *RPLP0*, *RPLP1*, *RPL8*, and *SERF2*, indicating concerted remodeling of translation and proteostasis factors. Over 2,000 modifications showed an absolute $\log_2FC$ read count of at least 2 between infected and control cells, with m^6A being the most abundant (659), followed by m^5C (665), pseU (600), and inosine (334). Several events co-occurred on the same mRNA (e.g., *RPLP0-203* with m^6A and *RPLP0-202* with pseudouridine), consistent with combinatorial rather than isolated modification. Importantly, many of these changes were isoform-specific (e.g., *RPLP0-203*, *RPLP1-201* and *HNRNPDL-201*), suggesting that chemical modifications act as an additional regulatory layer at the transcript, rather than gene, level. Most enriched sites were found on transcripts upregulated in infected cells, linking

increased abundance with targeted RNA marking and supporting a model of coordinated isoform remodeling and epitranscriptomic reprogramming during ZIKV infection.

Discussion

ZIKV's oncolytic activity in GBM has been recognized since 2017, yet the molecular mechanisms underlying this phenomenon remain insufficiently defined. Here, we provide an integrated view of how ZIKV reshapes the regulatory landscape of GBM cells by jointly interrogating transcriptional and, for the first time, epitranscriptomic alterations. Transcriptome-wide changes revealed dominant regulation at the isoform level, primarily driven by alternative splicing, in agreement with evidence showing that RNA modifications such as m⁶A and m⁵C can modulate splice-site selection and translational output (ROUNDTREE et al., 2017; ZHAO et al., 2017; BARBIERI & KOUZARIDES, 2020). Canonical interferon-stimulated pathways emerged as central components of the antiviral response. Complementing these findings, epitranscriptomic profiling uncovered extensive and isoform-specific remodeling of m⁶A, m⁵C, pseudouridine, and inosine marks, frequently occurring in combinatorial patterns on single transcripts. Together, these multilayered signatures indicate that ZIKV infection triggers coordinated immune activation and deep structural reprogramming across both transcriptional and RNA-modification layers.

Isoform-resolved analysis proved substantially more informative than gene-level summaries in capturing the regulatory reprogramming induced by ZIKV. Gene-level estimates inherently average the expression of all transcripts produced by a locus, obscuring meaningful regulatory shifts when individual isoforms follow divergent trajectories, for instance, when one isoform is strongly induced while another is repressed (SONESON et al., 2016). By contrast, isoform-level quantification reveals remodelings that affect coding potential, UTR structure, RNA-binding motifs, and protein-interaction domains (WANG et al., 2008). In our dataset, coordinated modulation of isoforms together with changes in cytoskeletal and chromatin-associated transcripts indicates broad rearrangement of transcriptional and post-transcriptional networks. Such remodeling is consistent with a ZIKV-induced shift in cellular state, aligning with recent evidence that GBM cells undergo stress-driven reprogramming upon flaviviral infection (BULSTRODE et al., 2022; CHEN et al., 2018; CHEN et al., 2022; CHEN et al., 2023; ZHU et al., 2017).

Although the antiviral innate immune program activated in U-87MG cells largely reflects canonical interferon-driven pathways, this universality does not diminish its relevance to oncolysis. Innate signaling can potentiate tumor cell death indirectly via chemokine-mediated recruitment of NK and CD8⁺ T cells through factors, such as *CXCL10* and *CCL5*, and directly, by imposing metabolic, proteostatic, and replicative stress on genetically unstable tumor cells, thereby lowering the apoptotic threshold (DIAMOND & FARZAN, 2013; BARBER, 2005). This immune-mediated amplification is well documented in oncolytic virotherapy, where bystander killing of non-infected tumor cells frequently arises from

interferon-dependent cytotoxic recruitment (CAO et al., 2023; RUSSELL et al., 2012). Beyond this canonical response, our transcriptomic–epitranscriptomic integration revealed GBM-specific vulnerabilities targeted by ZIKV, including the coordinated remodeling of ribosomal proteins (*RPLP0*, *RPLP1* and *RPL8*), proteostasis regulators (*SERF2*), RNA-processing factors (*EXOSC4*), and histone variants (*H3C4* and *H4C16*), together with widespread isoform-specific chemical marking. These signatures extend beyond standard antiviral responses and likely reflect selective pressure on pathways essential for GBM proliferation and survival.

Moreover, the extensive remodeling of translation- and proteostasis-associated transcripts observed in our dataset is consistent with a broader phenomenon well documented in virology: the virus-induced host shutoff. Many RNA viruses selectively suppress global host protein synthesis, whether through ribosomal pausing, cleavage of translation factors, or degradation of host mRNAs, thereby redirecting the translational machinery toward viral RNAs, which often harbor IRES-like elements or alternative structures that permit preferential translation under stress conditions (WALSH & MOHR, 2011; JAN et al., 2016). Such translational collapse disproportionately impacts genetically unstable tumor cells, which are already burdened by heightened proteotoxic stress and depend on tightly regulated protein homeostasis for survival. Consequently, ZIKV-induced modulation of host translation could represent an additional, previously underappreciated contributor to its oncolytic potential in GBM. Future studies should therefore investigate whether ZIKV leverages selective translation mechanisms or host-shutoff pathways in a manner that accentuates tumor-specific cytotoxicity.

Short-read Illumina RNA-seq provided high-depth, high-accuracy quantification of transcript-level expression changes, enabling sensitive detection of differential isoform usage. However, probabilistic isoform inference from short reads can mask transcript-specific events. In contrast, Nanopore long-read sequencing resolves full-length isoforms and directly detects RNA modifications, albeit at lower sequencing depth which constrains differential-expression power (CHEN et al., 2025). By integrating both platforms, we orthogonally validated isoform-level regulation: 389 isoforms identified in short-read analysis were independently recovered in long-read data with concordant direction of change, and only one isoform was unique to the long-read dataset. This cross-platform concordance strengthens the inference that the observed remodeling reflects genuine biological regulation rather than computational artifacts. Additionally, the long-read data enabled transcript-specific mapping of chemical modifications, allowing the joint interpretation of expression shifts and epitranscriptomic dynamics.

The concentrated and isoform-specific enrichment of m⁶A, m⁵C, pseudouridine, and inosine on host transcripts, particularly those linked to translation and proteostasis such as *RPLP0*, *RPLP1*, *RPL8*, and *SERF2*, indicates that ZIKV infection drives coordinated epitranscriptomic reprogramming in U-87MG cells. Functionally, m⁶A and m⁵C modulate mRNA stability and translational efficiency, enabling selective prioritization or repression of specific transcripts; pseudouridine enhances RNA structural stability and modulates decoding; and A-to-I editing alters base-pairing and splice-site recognition, generating alternative

isoforms or modifying coding potential (GOKHALE et al., 2016). The multi-site, multi-mark patterns observed here suggest a regulatory architecture in which GBM cells simultaneously stabilize stress-responsive transcripts while reconfiguring translational output under proteotoxic pressure. Such remodeling, affecting RNA stability, translation, and isoform usage, aligns with a shift to a high-stress, low-homeostasis state that is known to sensitize tumor cells to cytopathic injury. Together, these findings support the view that epitranscriptomic alterations represent an active regulatory layer contributing to the functional collapse and selective vulnerability of GBM cells during ZIKV infection.

Despite the comprehensive nature of this work, several limitations merit consideration, including the use of specific viral and cell lineages, the absence of primary or three-dimensional tumor models, the restricted sensitivity of long-read sequencing for low-abundance isoforms and RNA modifications, and the reliance on bulk RNA-seq without single-cell resolution. Most importantly, the mechanistic contributions of the isoforms and modification sites identified here remain to be functionally validated. Building on these observations, our next efforts will refine the genomic and structural context of each modification by mapping sites to specific transcript regions (5'UTR, CDS, 3'UTR, or splice junctions), assessing motif compatibility with known writers and editors, and examining co-localization with reader proteins using public eCLIP datasets. Functionally, perturbation of key enzymes such as METTL3/14 in U-87MG cells, with and without ZIKV infection, combined with targeted validation of top sites and reporter assays contrasting wild-type and site-disrupting mutants, will be used to resolve their effects on mRNA stability, translation, and viral-host interactions. Together, this transcript-centric and experimentally driven framework is expected to transform the descriptive landscape presented here into mechanistic insight, providing a strong foundation for future studies aimed at elucidating how ZIKV reshapes GBM cell biology and how these pathways might be leveraged for therapeutic development. Overall, our findings demonstrate that ZIKV infection elicits a multilayered regulatory shift in GBM cells, coupling robust antiviral signaling with extensive isoform remodeling and coordinated epitranscriptomic reprogramming. By integrating short- and long-read sequencing, we reveal that transcript- and modification-level regulation far exceeds gene-level summaries, uncovering previously unrecognized molecular vulnerabilities and stress pathways engaged during infection. These results provide a coherent mechanistic framework for understanding how ZIKV reshapes the transcriptional and post-transcriptional landscape of GBM cells and establish a foundation for future studies exploring its potential as a biologically informed oncolytic agent.

References

BARBER, G. N. Host defense, viruses and apoptosis. **Cell Death and Differentiation**, v. 8, n. 2, p. 113–126, 1 fev. 2001.

BARBIERI, I.; KOUZARIDES, T. Role of RNA modifications in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 20, n. 6, p. 303–322, 16 abr. 2020.

BULSTRODE, H. et al. Myeloid Cell Interferon Secretion Restricts Zika Flavivirus Infection of Developing and Malignant Human Neural Progenitor Cells. **Neuron**, v. 110, n. 23, p. 3936–3951, 2022.

CAO, L. L.; KAGAN, J. C. Targeting innate immune pathways for cancer immunotherapy. **Immunity**, v. 56, n. 10, p. 2206–2217, 12 set. 2023.

CARLILE, T. M. et al. mRNA structure determines modification by pseudouridine synthase 1. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 10, p. 966–974, 2 set. 2019.

CHEN, L. et al. Oncolytic Zika virus promotes intratumoral T cell infiltration and improves immunotherapy efficacy in glioblastoma. **Molecular Therapy — Oncolytics**, v. 24, p. 522–534, 1 fev. 2022.

CHEN, Q. et al. Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate. **mBio**, v. 9, n. 5, 18 set. 2018.

CHEN, Q. et al. ZIKV infection differentially affects the transcriptional profiles in HTR8 and U251 cells. **Virus Research**, v. 334, p. 199166, 7 jul. 2023.

CHEN, Y. et al. A systematic benchmark of Nanopore long-read RNA sequencing for transcript-level analysis in human cell lines. **Nature Methods**, v. 22, n. 4, p. 801–812, 13 mar. 2025.

DE OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Congenital Zika virus infection. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407, 3 out. 2016.

DIAMOND, M. S.; FARZAN, M. The broad-spectrum antiviral functions of IFIT and IFITM proteins. **Nature reviews. Immunology**, v. 13, n. 1, p. 46–57.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F. 509 zika virus (i). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**. v. 46, n. 5, p. 509–520, set. 1952.

GOKHALE, N. et al. N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. **Cell Host Microbe**. v. 20, n. 5, p. 654–665, 2016.

HUSSAIN, S. et al. NSun2-Mediated Cytosine-5 Methylation of Vault Noncoding RNA Determines Its Processing into Regulatory Small RNAs. **Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 255–261, 1 jul. 2013.

LOVE, M. et al. Moderated Estimation of Fold Change and Dispersion for RNA-Seq Data with DESeq2. **Genome Biol.** v. 15, n. 12, 2014.

JAN, E.; MOHR, I.; WALSH, D. A Cap-to-Tail Guide to mRNA translation Strategies in Virus-Infected Cells. **Annual Review of Virology**, v. 3, n. 1, p. 283–307, 8 ago. 2016.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **Journal of Basic Microbiology**. Wiley. v. 58, p. 3-16, jan. 2018.

JOUSHEGHANI, Z.; PATRO R. Oarfish: Enhanced probabilistic modeling leads to improved accuracy in long read transcriptome quantification. **bioRxiv** [Preprint]. 1 mar. 2024.

LIU, J. et al. A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 93–95, 6 dez. 2013.

LOUIS DN, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Neuro Oncol**. v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021.

MAMEDE, I.; QUEIROZ, L. Isoformic: Isoform-level biological interpretation of transcriptomic data [repositório no GitHub]. Belo Horizonte: GitHub, 2023. Disponível em: https://luciorq.github.io/isoformic/articles/isoformic_intro.html. Acesso em: 20 out. 2025.

MEYER, K. D.; JAFFREY, S. R. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 313–326, 9 abr. 2014.

HENG, L. Minimap2: pairwise alignment for nucleotide sequences, *Bioinformatics*, v. 34, n. 18, p. 3094–3100. set. 2018.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. **JAMA Pediatrics**. American Medical Association, 1 mar. 2017.

PATRO, R. et al. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nat Methods**. v. 14, n. 4, p. 417-419. abr, 2017.

ROUNDTREE, I. A. et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1187–1200, 1 jun. 2017.

RUSSELL, S. J.; PENG, K.-W.; BELL, J. C. Oncolytic virotherapy. **Nature Biotechnology**, v. 30, n. 7, p. 658–670, 1 jul. 2012.

SONESON, C. et al. Differential analyses for RNA-seq: transcript-level estimates improve gene-level inferences. **F1000Research**, v. 4, p. 1521, 29 fev. 2016.

WALES-MCGRATH, B. et al. Changes in ADAR RNA editing patterns in CMV and ZIKV congenital infections. **BMC Genomics**. v. 24, n. 685, p. 1-23, 2023.

WALKLEY, C. R.; LI, J. B. Rewriting the transcriptome: adenosine-to-inosine RNA editing by ADARs. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 205, 30 out. 2017.

WALSH, D.; MOHR, I. Viral subversion of the host protein synthesis machinery. **Nature Reviews Microbiology**, v. 9, n. 12, p. 860–875, 17 out. 2011.

WANG, E. T. et al. Alternative isoform regulation in human tissue transcriptomes. **Nature**, v. 456, n. 7221, p. 470–476, 1 nov. 2008.

WANG, X. et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 117–120, 26 nov. 2013.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.** v. 110, n. 4, p. 569-572, jun. 2015.

ZHAO, B. et al. Post-transcriptional gene regulation by mRNA modifications. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 18, n. 1, p. 31–42, 3 nov. 2016.

ZHENG, G. et al. ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. **Molecular Cell**, v. 49, n. 1, p. 18–29, 21 nov. 2012.

ZHU, Z. et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. **Journal of Experimental Medicine**. v. 214, n. 10, p. 2843–2857, 2017.

ZHU, A. et al. Nonparametric expression analysis using inferential replicate counts, **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. 18, p. e105, 10 out. 2019.

6. Capítulo 3.

Neste capítulo, reportamos por meio de uma comunicação breve, a investigação sobre a possível participação do receptor de membrana PTPRZ1 na infecção por ZIKV na linhagem de GBM U-87MG, tendo como base evidências prévias da literatura que sugeriram um papel deste receptor na infecção de células neuronais por ZIKV e no desenvolvimento de GBMs. A metodologia dos experimentos realizados neste capítulo está descrita em detalhes no Anexo I. Inicialmente, resultados preliminares sugeriram uma superexpressão do PTPRZ1 em células infectadas, bem como um efeito do bloqueio do receptor sobre a penetração e a infectividade viral. No entanto, análises subsequentes por sequenciamento direto de RNA, citometria de fluxo e imunofluorescência revelaram que a expressão do PTPRZ1 é muito baixa nessa linhagem. Além disso, experimentos adicionais de bloqueio com anticorpos após refinamento do protocolo não confirmaram um papel relevante desse receptor na infecção. Em breve, pretendemos testar a consistência estes achados por meio da avaliação da infectividade do ZIKV em células de U-87MG depletadas do receptor PTPRZ1 por meio do sistema CRISPR-Cas9. Após a conclusão destes experimentos, este trabalho será submetido para publicação em periódico indexado no formato de comunicação breve.

Short communication: Low Expression of the Membrane Receptor *PTPRZ1* and Lack of Evidence for Its Role in Zika Virus Infection of the Glioblastoma Cell Line U-87 MG

Diego Menezes¹; Renato Santana Aguiar¹

Laboratory of Integrative Biology, Department of Genetics, Ecology and Evolution, ICB, UFMG¹

A study on the molecular mechanisms underlying Zika virus (ZIKV) interference with central nervous system (CNS) development during embryogenesis reported overexpression of the protein tyrosine phosphatase receptor type Z1 (*PTPRZ1*) in brains of stillborns with congenital Zika syndrome. Intriguingly, *PTPRZ1* is also a well-known marker of glioblastoma (GBM) severity and progression, playing a key role in cell–cell communication and tumor growth. Although the oncolytic effect of ZIKV against GBM is well established, its mechanisms remain poorly defined. Here, we evaluated *PTPRZ1* expression and its potential role in ZIKV infection of the GBM cell line U-87 MG. Paired expression assays and viral kinetics quantified by RT-qPCR at 0, 24, 48, and 72 hours post-infection showed significant induction of *PTPRZ1* expression ($p = 0.000228$). However, RNA-seq of infected U-87 MG cells did not confirm differential expression of this gene. Finally, immunological blockade of the extracellular domain of *PTPRZ1* did not significantly reduce ZIKV penetration or infectivity, suggesting that *PTPRZ1* does not play a major role in ZIKV entry into GBM cells.

ZIKV is a positive-sense single-stranded RNA flavivirus with a well-documented tropism for the CNS and oncolytic effect in GBM cells (MOORE et al., 2017; ZHOU et al., 2023). Aguiar et al. (2020) characterized the transcriptome of stillborn brains infected with ZIKV, identifying overexpression of the receptor *PTPRZ1* in infected brain tissue. This receptor is also a known marker of GBM growth and severity (Foehr et al., 2006). Here, we investigated the expression of *PTPRZ1* and its potential role during ZIKV #PE243 infection of the GBM cell line U-87 MG.

To assess *PTPRZ1* expression kinetics during ZIKV infection, U-87 MG cells were seeded in 24-well plates and infected 24 h later at a multiplicity of infection (MOI) of 0.3632 plaque-forming units (PFU) per cell. Supernatants were collected on triplicate wells at 0, 24, 48, and 72 h post-infection for viral load quantification, and adherent cells were lysed and stored at -80°C . Total RNA was extracted using the PureLink RNA Mini Kit (Invitrogen #12183025) following the manufacturer's instructions, quantified by fluorometry, and normalized across

samples. Viral RNA levels and *PTPRZ1* expression were quantified by RT-qPCR using specific primers and probes, with *GAPDH* as internal control. Relative expression was calculated using the $2^{-\Delta\Delta CT}$ method. Statistical analyses were performed in R v4.3.3 using generalized linear models with appropriate distributions.

To investigate the role of *PTPRZ1* in ZIKV entry and infectivity, U-87 MG cells were seeded in duplicates in 24- and 96-well plates, respectively, 24 h prior to assays. Plates were incubated at 4 °C with serial dilutions (20, 4, 0.8, and 0.16 µg/mL) of extracellular domain anti-*PTPRZ1* antibodies or isotype IgG control for 1 h before infection, then infected at a MOI of 0.3632 PFU/cell. For the infectivity assay, the corresponding antibody concentration was maintained in the medium throughout the experiment. Viral penetration was assessed 5 h post-infection by RT-qPCR quantification of viral RNA extracted from lysed cell pellets using the same kit and protocol described above. Infectivity was assessed 72 h post-infection by immunofluorescence detection of ZIKV envelope protein, with infected cells quantified automatically across multiple fields using microscope software. Data were analyzed in R using ANCOVA or Student's t-test, as appropriate.

Kinetic assays showed a significant increase in *PTPRZ1* expression in U-87 MG cells parallel to ZIKV replication, peaking at 72 h post-infection with a 1.14-fold change relative to controls ($p = 0.000228$, Fig. 1).

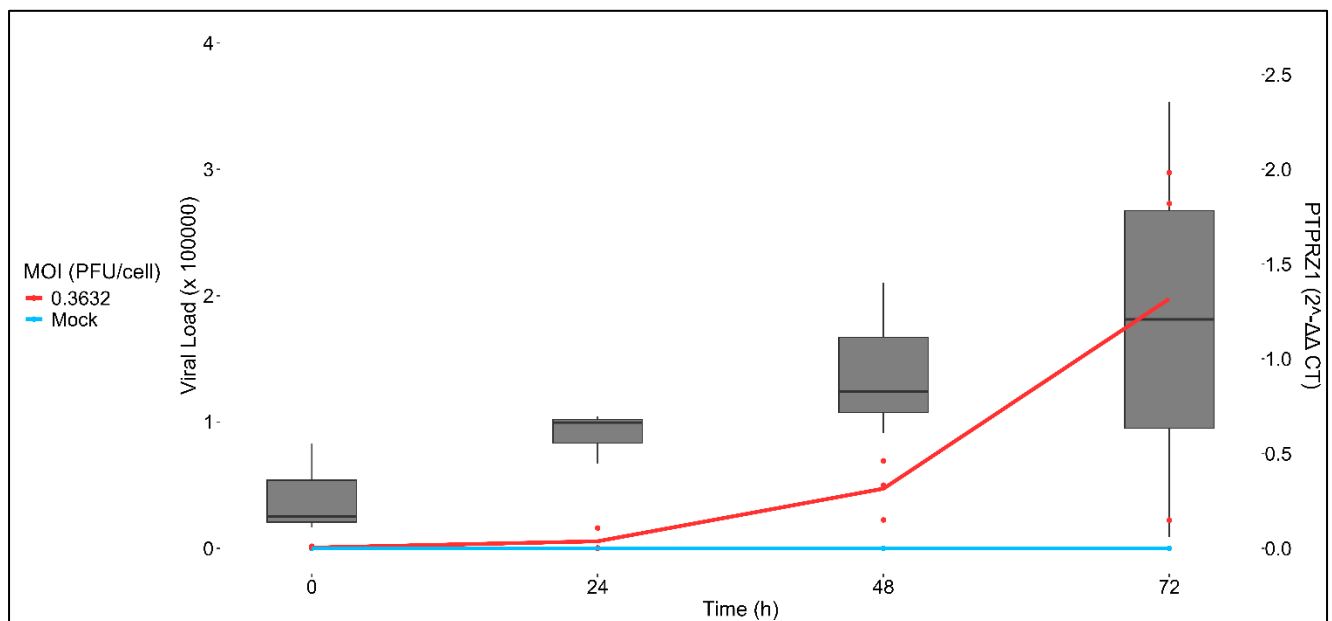


Figure 1. ZIKV growth curve associated with *PTPRZ1* expression. Boxplots show *PTPRZ1* expression levels, and lines represent viral growth curves based on triplicate viral load

measurements (points) quantified by RT-qPCR and normalized to endogenous control (*GAPDH*). Data are shown for mock (blue) and ZIKV-infected cells at MOI 0.3632 (red) across time points.

However, RNA-seq analysis of the same cell line 48 h post-ZIKV infection detected only 18 total reads of *PTPRZ1* across infected and mock triplicates and indicated no differential expression of this gene. This very low expression was confirmed by flow cytometry, which failed to detect *PTPRZ1* protein on the U-87 MG cell surface (Fig. 2).

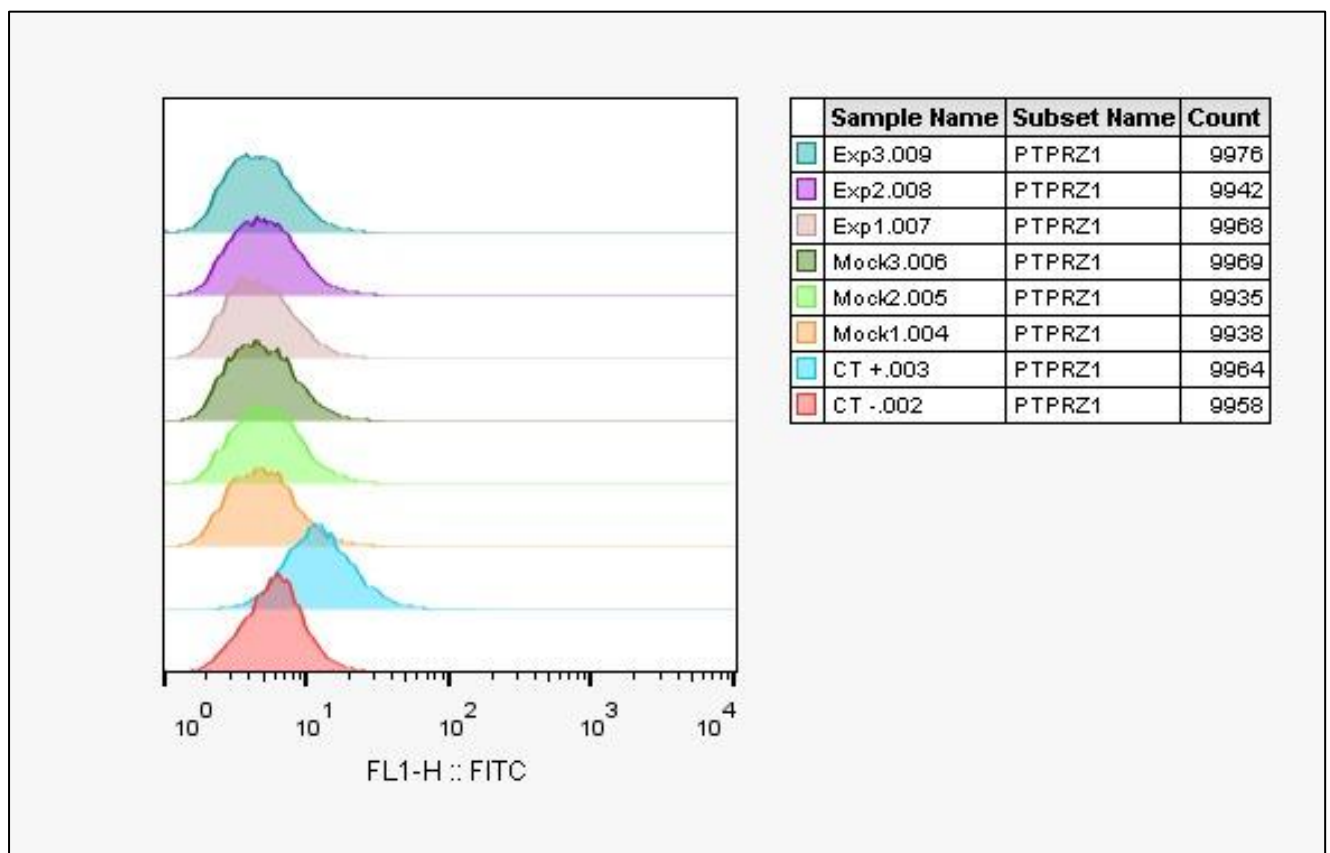


Figure 2. Flow cytometry analysis of *PTPRZ1* surface expression in U-87 MG cells. Representative histograms of flow cytometry staining of U-87 MG cells under mock or ZIKV-infected (MOI = 0.3632) conditions. Triplicates were analyzed for each condition. Unstained cells served as a negative control, and actin-stained cells served as a positive control for staining and acquisition. Anti-*PTPRZ1* staining revealed no detectable increase in fluorescence signal compared to the unstained control, indicating minimal surface expression of *PTPRZ1* in U-87 MG cells under either condition.

Consistent with these findings, immunological blockade of *PTPRZI* did not reduce ZIKV entry or infectivity in U-87 MG cells.

Our data indicate that, despite a modest increase in *PTPRZI* transcript levels during ZIKV infection, this gene is unlikely to play a functional role in viral entry or infectivity in U-87 MG cells. These findings reflect differences in the molecular mechanisms of ZIKV infection, even among cell lines derived from tissues in close anatomical proximity (AGUIAR et al., 2020). We emphasize the need to complement blockade assays with gene knockout experiments to properly establish *PTPRZI*'s role in ZIKV entry in GBM cells. Although the impact of our results is limited, replicating differential expression experiments of ZIKV infection on U-87 MG cells may guide future research aiming to elucidate the molecular mechanisms of ZIKV's oncolytic effect in GBM.

References

- AGUIAR, R. S. et al. Molecular alterations in the extracellular matrix in the brains of newborns with congenital Zika syndrome. **Science Signaling**, v. 13, n. 635, 9 jun. 2020.
- MOORE, C. A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital Zika syndrome for pediatric clinicians. **JAMA Pediatrics**, v. 171, n. 3, p. 288, 3 nov. 2016.
- ZHOU, C. et al. Oncolytic zika virus: new option for glioblastoma treatment. **DNA And Cell Biology**, v. 42, n. 6, p. 267–273, 9 nov. 2022.

7. Discussão

A atividade oncolítica do ZIKV em GBM tem sido demonstrada desde 2017 (ZHU et al., 2017). Desde então, diversos estudos buscaram investigar os mecanismos moleculares que governam esse fenômeno (ZHU et al., 2020; HUANG et al., 2024; CHEN et al., 2022; CHEN et al., 2023; KAO et al., 2023; BULSTRODE et al., 2022; PEREIRA et al., 2021; XU et al., 2022; LI et al., 2019; XIAO et al., 2022; LI et al., 2020; NAIR et al., 2021; ZUPIN et al., 2018; VALDEZ et al., 2019; SHER et al., 2022; MAO et al., 2022; ZHOU et al., 2021; SRIVASTAVA et al., 2020; LU et al., 2019; ROUTHU et al., 2018; MEANS et al., 2019; SEN et al., 2022; WIELAND et al., 2021; WANG et al., 2020; ZWERNIK et al., 2021; IANNOLO et al., 2019; HE et al., 2025; MARTÍNEZ-PUENTE et al., 2024; XU et al., 2019; LIMA et al., 2017; DABAJA et al., 2018; CHAVALI et al., 2017). Paralelamente, diferentes grupos de pesquisa dedicaram-se a quantificar experimentalmente a citotoxicidade viral, empregando modelos diversos de GBM e linhagens ou vetores virais derivados do ZIKV (NOVAES et al., 2024; VICTORIO et al., 2024; GARCIA Jr. et al., 2023; MARINOWIC et al., 2024b; FERREIRA et al., 2024; CHEN et al., 2018; YANG et al., 2020; POHLKING et al., 2023; FORMANSKI et al., 2024; TRUS et al., 2020; GRUNWALD et al., 2023; CRANE et al., 2020; NGO et al., 2023; KRETSCHMER et al., 2020; SVYATCHENKO et al., 2019). Esta tese teve como objetivo investigar os mecanismos moleculares da interação entre ZIKV e GBM, com ênfase na caracterização global das vias celulares afetadas por meio do sequenciamento de RNA total. Para delinear o panorama atual da literatura, conduzimos uma revisão sistemática de artigos primários que reportaram DEGs em modelos de GBM infectados pelo ZIKV a partir de abordagens transcriptômicas publicados até 5 de março de 2025. Em seguida, caracterizamos experimentalmente o transcriptoma da linhagem U-87MG infectada com a cepa PE243 do ZIKV, ambos inéditos nesse tipo de abordagem. Além disso, analisamos simultaneamente o epitranscriptoma da infecção por ZIKV em GBM, ainda não descrito até o presente momento. Por fim, avaliamos o papel funcional do receptor de membrana *PTPRZ1*, previamente apontado como um potencial alvo em tecidos neurais infectados pelo ZIKV, na mediação da entrada viral em células de GBM.

A revisão sistemática apontou as vias de estresse celular e de ativação imune, especialmente aquelas associadas aos interferons dos tipos I e III, como processos recorrentes em células de GBM infectadas pelo ZIKV. Além disso, foram destacados os genes *PMAIP1* e *ANKRD33B* como potenciais alvos de interesse para a investigação dos mecanismos relacionados à infecção desse vírus nessa linhagem tumoral. Entretanto, algumas limitações importantes devem ser

reconhecidas. As inferências obtidas a partir da análise de dados transcriptômicos são, por natureza, restritas, constituindo um ponto de partida para investigações funcionais dos mecanismos moleculares subjacentes a um fenômeno biológico. Durante a triagem dos artigos identificados na busca, 42 registros foram excluídos por não acessarem o transcriptoma de células de GBM infectadas por ZIKV. Estes desenhos experimentais diversos em muitos casos são capazes de oferecer respostas tão ou mais informativas que listas de DEGs em um dado contexto. Essa diversidade de metodologias e conclusões é mais adequadamente abordada por uma revisão de escopo, atualmente em andamento, mas ainda em estágio incipiente e, portanto, não incluída nesta tese. Entre os artigos elegíveis para a revisão sistemática, a principal dificuldade de compilação dos resultados decorreu da ausência de padronização experimental e do relato incompleto de informações essenciais nas seções de *Métodos* e *Resultados*. Considerando a relevância dessas limitações, as recomendações do instrumento ToxRtool adaptado (SCHNEIDER et al., 2009; Anexo II), utilizado na avaliação dos estudos revisados, foram também aplicadas à redação do nosso artigo primário (Capítulo 2), com o objetivo de minimizar vieses de relato. Para dar seguimento às hipóteses levantadas pela revisão, realizamos a infecção da linhagem U-87MG de GBM, inédita nesse tipo de abordagem, com a igualmente inédita cepa PE243 do ZIKV. Ademais, conduzimos a primeira caracterização epitranscriptômica de células de GBM infectadas por esse vírus, ampliando substancialmente o escopo de compreensão das respostas celulares à infecção.

No nosso artigo experimental, identificamos os genes *IFIT2*, *CCL5*, *RSAD2*, *CXCL10*, *OASL*, *CXCL8*, *H3C4*, *CXCL11*, *IFIT1*, *RAET1L*, *IL7R*, *CXCL1*, *IFNL1*, *H4C16*, *HLA-DOB*, *ACTN2*, *RND1* e *EXOSC4*, além do RNA *ENSG00000286610*, com expressão aumentada, e o gene *CCDC85A*, juntamente com o RNA *RN7SL731P*, com expressão reduzida na linhagem U-87MG infectada por ZIKV. Este conjunto é majoritariamente composto por genes associados à resposta antiviral dependente de interferon, todos superexpressos: *IFIT1*, *IFIT2*, *OASL*, *RSAD2*, *CCL5*, *CXCL10*, *CXCL11*, *CXCL8*, *CXCL1*, *IFNL1*, *IL7R* e *HLA-DOB*. Essa categoria inclui os únicos DEGs que figuram entre os 12 genes consistentemente superexpressos identificados pela revisão sistemática apresentada no Capítulo 1: *IFNL1*, *OASL* e *CCL5*. Assim, a ativação de mediadores antivirais canônicos da resposta imune inata em células de GBM infectadas por ZIKV é novamente corroborada.

Curiosamente, um padrão semelhante foi observado em outros modelos de viroterapia em GBM: células infectadas pelo paramixovírus oncolítico Leningrad-16 (sarampo) exibem forte indução de genes estimulados por interferon, quimiocinas e genes pró-morte celular (AMMOUR et al., 2022). Paralelamente, o vírus oncolítico VV-GMCSF-Lact (*vaccinia*)

desencadeia respostas inflamatórias convergentes do ponto de vista gênico, tanto em análises em população celular (bulk; SEMENOV et al., 2023) quanto em transcriptômica de célula única (single-cell; SEMENOV et al., 2025). Ainda, adenovírus oncolíticos como CAN-2409 promovem expressão robusta de interferons e genes pró-inflamatórios em gliomas pediátricos (KOCH et al., 2023), reforçando que a ativação de vias imunes é um eixo compartilhado entre diferentes vetores terapêuticos já validados ou em ensaios clínicos. Adicionalmente, alterações secretômicas induzidas por vírus oncolíticos, como descrito por Godlewski e colaboradores (GODLEWSKI et al., 2021), evidenciam uma plasticidade transcriptômico-proteica que converge com os achados identificados no Capítulo 2. Assim, ainda que esses estudos empreguem vírus distintos, todos revelam assinaturas consistentes de estresse celular, inflamação e reconfiguração estrutural, efeitos estreitamente alinhados aos observados na infecção por ZIKV, reforçando a robustez e plausibilidade biológica dos achados desta tese.

Outro padrão conservado em relação à revisão é a prevalência de genes com expressão aumentada em comparação àqueles com expressão reduzida. No presente estudo, *CCDC85A* é o único gene significativamente reprimido em GBM durante a infecção por ZIKV. Associado à regulação do citoesqueleto e à adesão celular, sua inibição reforça a hipótese de que o vírus suprime vias de crescimento e adesão, colocando-o, ao lado de *PMAIP1* e *ANKRD33B* (discutidos na revisão), como um alvo promissor para a investigação da interação ZIKV-GBM. Por fim, cinco genes relacionados à estrutura e sinalização celular apresentaram expressão aumentada em U-87MG sob infecção por ZIKV: *ACTN2*, *RND1*, *EXOSC4*, *H3C4* e *H4C16*. Este grupo, que inclui duas histonas canônicas, sugere que, além da ativação imune, a célula passa por profundas alterações estruturais e epigenéticas, destacando a relevância da caracterização desta camada de informação na elucidação dos mecanismos moleculares investigados nesta tese.

A regulação co-transcricional, em especial o mecanismo de *splicing* alternativo, representa uma fração expressiva das alterações observadas em células de GBM infectadas por ZIKV. No presente estudo, 1.302 transcritos foram identificados como diferencialmente expressos, número substancialmente superior aos 21 genes diferencialmente expressos discutidos no parágrafo anterior. Parte dessa discrepância, contudo, reflete limitações inerentes às análises conduzidas em nível gênico. Quando um mesmo gene apresenta múltiplas isoformas com padrões opostos de regulação, por exemplo, uma fortemente induzida e outra reprimida, o valor médio de expressão pode mascarar a significância estatística da variação, produzindo a falsa impressão de ausência de regulação diferencial. Esse fenômeno torna-se evidente apenas por meio da análise em nível de isoformas. Entre os cinco artigos incluídos na nossa revisão

sistemática, nenhum realizou essa abordagem com o propósito de contornar tal viés. A integração dos dados epitranscritômicos acrescenta uma nova dimensão à interpretação das alterações de expressão gênica e de isoformas observadas em células U-87MG infectadas por ZIKV. Modificações de RNA como m⁶A, m⁵C, pseudouridina e I parecem atuar modulando a estabilidade, a eficiência traducional e o processamento dos transcritos, oferecendo um mecanismo rápido e reversível de ajuste da resposta celular. A concentração de múltiplos tipos de modificações em genes-chave de tradução e proteostase como *RPLP0*, *RPLP1*, *RPL8* e *SERF2* sugere um remodelamento coordenado das vias ribossomais e de dobramento proteico, possivelmente associado à reprogramação da maquinaria celular das células de GBM (ISHII et al., 2006; DAS et al., 2016). Esses resultados indicam que a resposta induzida pelo ZIKV vai além da ativação de genes interferon-dependentes, envolvendo camadas regulatórias específicas de isoformas e de modificações químicas do RNA. Essa visão integrativa destaca o epitranscriptoma como uma fonte inédita de controle e variabilidade, abrindo novas hipóteses sobre como o remodelamento em nível de RNA pode contribuir tanto para a adaptação viral quanto para a vulnerabilidade seletiva observada em tumores infectados por ZIKV.

Visando acrescentar investigações funcionais ao panorama de evidências aqui discutido, averiguamos o papel do receptor de membrana *PTPRZ1* durante a infecção de ZIKV em U-87MG. Inicialmente, a quantificação por RT-qPCR sugeriu uma indução aparente da expressão de *PTPRZ1* ao longo da progressão da infecção; contudo, experimentos subsequentes com abordagens alternativas não corroboraram essa associação. De forma consistente, a caracterização transcriptômica por sequenciamento de RNA total, realizada no mesmo desenho experimental, não evidenciou expressão diferencial de *PTPRZ1*, em contraste com o observado em tecido neural proliferativo (AGUIAR et al., 2020). Várias explicações são plausíveis. Em primeiro lugar, a linhagem U-87MG apresenta expressão basal muito baixa de *PTPRZ1* em comparação com outras linhagens de GBM, constatação presente nos experimentos iniciais e apoiada pela literatura (LU et al., 2005). Além disso, a extrapolação de mecanismos de resposta entre modelos neuronais e gliomatosos deve ser feita com cautela. Por fim, diferenças de sensibilidade entre as técnicas empregadas configuram um viés relevante, uma vez que o sequenciamento de RNA total é consideravelmente mais sensível que a quantificação por RT-qPCR e, por isso, deve pesar mais na avaliação dessa hipótese. Apesar do conjunto de indícios de baixa expressão de *PTPRZ1* em U-87MG, optou-se por manter essa linhagem no ensaio de bloqueio imunológico do receptor, a fim de preservar a padronização experimental. À época da execução desse ensaio, imaginou-se que a baixa expressão do receptor poderia, em tese, favorecer a etapa de bloqueio, já que uma menor densidade de proteína na membrana exigiria

menor quantidade de anticorpos para atingir a saturação. De todo modo, os experimentos de competição por afinidade descartaram o envolvimento direto de *PTPRZI* na entrada do ZIKV em U-87MG. Ainda assim, a ausência de um papel direto não implica ausência de relevância funcional global, pois processos diversos, a exemplo de sinalização e adesão celular, podem influenciar indiretamente a suscetibilidade viral (GREBER et al., 2002; BHELLA et al., 2015). Experimentos adicionais, como a depleção gênica de *PTPRZI* por edição genômica, serão necessários para elucidar de forma definitiva seu papel nessa linhagem durante a infecção por ZIKV.

O conjunto de evidências apresentado nesta tese permite propor um modelo integrador para os mecanismos utilizados pelo ZIKV para infectar células de GBM. A infecção parece desencadear, de forma coordenada, uma resposta de estresse celular marcada pela ativação de genes interferon-dependentes e pelo remodelamento de vias de tradução, proteostase e metabolismo energético. Paralelamente, observam-se alterações profundas na arquitetura do transcriptoma, nas quais o splicing alternativo e as modificações epitranscritômicas (m⁶A, m⁵C, pseudouridina e I) desempenham papel central na modulação da estabilidade, da tradução e do processamento de RNAs específicos. Essa reorganização pós-transcricional e química do RNA sugere um mecanismo de reprogramação global, em que o vírus explora a plasticidade do transcriptoma tumoral para favorecer sua replicação, ao mesmo tempo em que desestabiliza redes de manutenção celular do GBM, culminando em morte seletiva das células neoplásicas. Os resultados apresentados nos Capítulos 1, 2 e 3 delineiam, portanto, um modelo coerente no qual as alterações induzidas pelo ZIKV parecem emergir da convergência entre desregulação de isoformas, remodelamento epitranscritômico seguidas de cascatas de ativação do sistema imune, integrando diferentes níveis de controle gênico e funcional. Apesar dos avanços, ainda permanecem em aberto questões sobre os alvos moleculares exatos dessas modificações e a extensão com que esses mecanismos contribuem para a especificidade tumoral do ZIKV. Esses pontos constituem direções promissoras para investigações futuras, que poderão refinar o entendimento das bases moleculares do efeito oncolítico do ZIKV em GBM.

Em conjunto, os resultados apresentados nesta tese contribuem para o entendimento dos múltiplos níveis de interação entre o ZIKV e as células de GBM, revelando camadas regulatórias complementares que vão da expressão gênica ao controle epitranscritômico. Embora o estudo tenha se concentrado em um modelo celular específico e em abordagens predominantemente *in silico*, as evidências obtidas delineiam um panorama coerente e biologicamente plausível, que fundamenta a proposição de novos mecanismos e hipóteses testáveis. Estudos futuros, incluindo análises em modelos primários, bem como em outras

linhagens imortalizadas, organoides cerebrais e sistemas animais, serão essenciais para validar a consistência desses achados e ampliar sua aplicabilidade translacional, considerando que o GBM é um tumor intrinsecamente heterogêneo. De forma abrangente, esta tese oferece uma contribuição incremental e sólida ao campo, fortalecendo a compreensão conceitual sobre a vulnerabilidade tumoral do GBM ao ZIKV. Esse propósito se alinha às perspectivas futuras do grupo de pesquisa e às parcerias estabelecidas, em especial com o Hospital Mário Penna, instituição de referência no tratamento oncológico. Nosso grupo de pesquisa pretende dar continuidade a este projeto, aplicando os conhecimentos aqui discutidos na concepção de vetores oncolíticos baseados no envelope do ZIKV. Estas etapas futuras visam transformar os achados conceituais desta tese em ferramentas experimentais com potencial terapêutico real.

8. Conclusão

A presente tese teve como objetivo investigar, em múltiplos níveis regulatórios, os mecanismos moleculares associados à interação entre o ZIKV e células de GBM. Os resultados obtidos ao longo dos três capítulos oferecem uma visão ampla e integrada desse fenômeno, revelando aspectos inéditos sobre a reprogramação transcricional e epitranscritômica induzida por essa infecção. De forma sintética, demonstramos que o ZIKV altera profundamente o padrão de expressão de GBM, com predominância de superexpressão gênica, levando à ativação robusta de vias de resposta imune inata antiviral mediadas por interferon. Paralelamente, a infecção impacta o processamento do RNA ao promover extensas alterações no uso de isoformas, bem como um remodelamento epitranscriptômico seletivo que afeta vias de tradução, proteostase e metabolismo energético. Esses achados evidenciam que a resposta ao ZIKV envolve múltiplos níveis de regulação: gênico, isoformas e epitranscriptômico, configurando um cenário molecular de alta complexidade. A hipótese de que *PTPRZ1*, biomarcador prognóstico do GBM, atuaria como receptor de entrada para o ZIKV não foi corroborada pelos ensaios cinéticos, de bloqueio e de competição, apontando que sua participação direta na infecção da linhagem U-87MG é improvável. Em conjunto, os resultados desta tese demonstram que a interação entre ZIKV e células de GBM é mediada por uma ampla reprogramação regulatória, integrando ativação antiviral, remodelamento isoforma-específico e reconfiguração epitranscriptômica marcada por padrões combinatórios de m⁶A, m⁵C, pseU e A→I. Esse panorama revela vulnerabilidades particulares do GBM, como a dependência de homeostase ribossomal, a suscetibilidade ao estresse proteotóxico e o colapso traducional, que podem ser exploradas terapeuticamente. Assim, esta tese contribui para o entendimento mecanístico da

infecção por ZIKV em GBM e estabelece bases conceituais e experimentais que podem futuramente orientar o campo do desenvolvimento de vírus oncolíticos para o tratamento desse tumor.

Referências Bibliográficas

AGUIAR, R. S. et al. Molecular alterations in the extracellular matrix in the brains of newborns with congenital Zika syndrome. **Sci. Signal**, v. 13, p. eaay6736, jun. 2020.

ALIFIERIS, C.; TRAFALIS, D. T. Glioblastoma multiforme: Pathogenesis and treatment. **Pharmacology and Therapeutics. Elsevier Inc**, v. 152, p. 63–82, jun. 2015.

AMMOUR, Y. et al. Transcriptome Analysis of Human Glioblastoma Cells Susceptible to Infection with the Leningrad-16 Vaccine Strain of Measles Virus. **Viruses**, v. 14, n. 11, p. 2433, 2 nov. 2022.

BAILEY, P; CUSHING, H. A Classification of the Tumours of the Glioma Group on a Histogenetic Basis, with a Correlated Study of Prognosis. **The British Journal Of Surgery**. v. 8, p. 554-555, 1926.

BARTON, E. S. et al. Junction Adhesion Molecule Is a Receptor for Reovirus segregate with the viral S1 gene, which encodes the viral attachment protein, 1. Attachment protein 1 forms an elongated fiber. **Cell**. v. 104, p. 441–451, fev. 2001.

BHELLA, D. The role of cellular adhesion molecules in virus attachment and entry. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 370, n. 1661, p. 20140035, 5 fev. 2015.

BMJ. Viruses in treatment of cancer. **British Medical Journal**. p. 1481-1482, dez. 1957.

BOURGONJE, A. M. et al. Intracellular and extracellular domains of protein tyrosine phosphatase PTPRZ-B differentially regulate glioma cell growth and motility. **Oncotarget**, v. 5, n. 18, p. 8690-8702, ago, 2014.

BRAT, D. J. et al. cIMPACT-NOW Update 5: Recommended Grading Criteria And Terminologies for IDH-mutant astrocytomas. **Acta Neuropathol (Berl)**. v. 139, n. 3, p. 603–608, 2020.

BULSTRODE, H. et al. Myeloid cell interferon secretion restricts Zika flavivirus infection of developing and malignant human neural progenitor cells. **Neuron**, v. 110, n. 23, p. 3936-3951.e10, dez. 2022.

CAMPBELL, S. A.; GROMEIER, M. Oncolytic viruses for cancer therapy I. Cell-external factors: Virus entry and receptor interaction. **Onkologie**, v. 28, p. 144-149, mar. 2005.

CARLILE, T. M. et al. mRNA structure determines modification by pseudouridine synthase 1. **Nature Chemical Biology**, v. 15, n. 10, p. 966–974, 2 set. 2019.

CHAVALI, P. L. et al. Neurodevelopmental protein Musashi-1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. **Science**, v. 357, n. 6346, p. 83–88, 7 jul. 2017.

CHEN, Q. et al. Treatment of Human Glioblastoma with a Live Attenuated Zika Virus Vaccine Candidate. **mBio**, v. 9, n. 5, 18 set. 2018.

CHEN, L. et al. Oncolytic Zika virus promotes intratumoral T cell infiltration and improves immunotherapy efficacy in glioblastoma. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 24, p. 522–534, mar. 2022.

CHEN, Q. et al. ZIKV infection differentially affects the transcriptional profiles in HTR8 and U251 cells. **Virus Research**, v. 334, p. 199166–199166, 7 jul. 2023.

COOK, M.; CHAUHAN, A. Clinical application of oncolytic viruses: A systematic review. **International Journal of Molecular Sciences**. **MDPI**, v. 21, p. 7505, out. 2020.

CRANE, A. T. et al. Zika virus-based immunotherapy enhances long-term survival of rodents with brain tumors through upregulation of memory T-cells. **PLoS ONE**, v. 15, n. 10, p. e0232858–e0232858, 1 out. 2020.

CUI, Q. et al. M6A RNA methylation regulates the Self-Renewal and tumorigenesis of glioblastoma stem cells. **Cell Reports**, v. 18, n. 11, p. 2622–2634, 1 mar. 2017.

DABAJA, M. Z. et al. Metabolic alterations induced by attenuated Zika virus in glioblastoma cells. **Cell & Bioscience**, v. 8, n. 1, 4 set. 2018.

DAS, S.; BHATTACHARYYA, N. P. Trans -activation of small EDRK-rich factor 2 (SERF2) promoter by Heat Shock Factor 1. **Biochemistry and Biophysics Reports**, v. 7, p. 188–194, 9 abr. 2016.

DE ANGELIS, L. M.; MELLINGHOFF, I. K. Virchow 2011 or how to ID(H) human glioblastoma. **Journal of Clinical Oncology**, v. 29, n. 34, p. 4473-4477, dez. 2011.

DE OLIVEIRA MELO, A. S. et al. Congenital Zika virus infection. **JAMA Neurology**, v. 73, n. 12, p. 1407, 3 out. 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F. 509 zika virus (i). Isolations and serological specificity. **Transactions Of The Royal Society Of Tropical Medicine And Hygiene**. v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952.

DOCK, G. The influences of complicated diseases upon leukemia*. **The American Journal of the Medical Sciences**. v. 127, n. 4, p. 563-592, abr. 1904.

DUEHR, J. et al. Tick-Borne Encephalitis Virus Vaccine-Induced Human Antibodies Mediate Negligible Enhancement of Zika Virus Infection In Vitro and in a Mouse Model . **mSphere**, v. 3, n. 1, fev. 2018.

ECDC. Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain Barré syndrome. **European Center for Disease Control and Prevention**. p. 1-15, dez. 2015.

EYLER, D. E. et al. Pseudouridylation of mRNA coding sequences alters translation. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 116, n. 46, p. 23068–23074, 31 out. 2019.

FERREIRA, R. S. et al. Differential Replication and Oncolytic Effects of Zika Virus in Aggressive CNS Tumor Cells: Insights from Organoid and Tumoroid Models. **Viruses**, v. 16, n. 11, p. 1764, 12 nov. 2024.

FISHER, J. L. et al. Epidemiology of Brain Tumors. **Neurologic Clinics**, v. 25, p. 867-890, nov. 2007.

FOEHR, E. D. et al. Targeting of the receptor protein tyrosine phosphatase β with a monoclonal antibody delays tumor growth in a glioblastoma model. **Cancer Research**, v. 66, n. 4, p. 2271–2278, fev. 2006.

FORMANSKI, J. P. et al. Transduction Efficiency of Zika Virus E Protein Pseudotyped HIV-1gfp and Its Oncolytic Activity Tested in Primary Glioblastoma Cell Cultures. **Cancers**, v. 16, n. 4, p. 814–814, 17 fev. 2024.

FUJIKAWA, A. et al. Targeting PTPRZ inhibits stem cell-like properties and tumorigenicity in glioblastoma cells. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 1-17, dez. 2017.

GARCIA Jr., G. et al. Differential Susceptibility of Ex Vivo Primary Glioblastoma Tumors to Oncolytic Effect of Modified Zika Virus. **Cells**, v. 12, n. 19, p. 2384–2384, 29 set. 2023.

GODLEWSKI, J. et al. Oncolytic virus therapy alters the secretome of targeted glioblastoma cells. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1287, 14 mar. 2021.

GOKHALE, N. et al. N6-Methyladenosine in Flaviviridae Viral RNA Genomes Regulates Infection. **Cell Host Microbe**. v. 20, n. 5, p. 654-665, 2016.

GREBER, U. F. Signalling in viral entry. **Cellular and Molecular Life Sciences (CMLS)**, v. 59, n. 4, p. 608–626, 1 abr. 2002.

GRUNWALD, V. et al. Development of Zika Virus E Variants for Pseudotyping Retroviral Vectors Targeting Glioblastoma Cells. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 19, p. 14487, 23 set. 2023.

HALLENBECK, S. et al. Pan cancer oncolytic vectors and methods of use thereof. **U.S. Patent US20050214923A1**. Out, 2005. Disponível em: Google Patents. Acesso em: 12/07/2025.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, mar. 2011.

HE, J. et al. TRIM38 Inhibits Zika Virus by Upregulating RIG-I/MDA5 Pathway and Promoting Ubiquitin-Mediated Degradation of Viral NS3 Protein. **Viruses**, v. 17, n. 2, p. 199–199, 30 jan. 2025.

HUANG, G.-G. et al. Atranorin inhibits Zika virus infection in human glioblastoma cell line SNB-19 via targeting Zika virus envelope protein. **Phytomedicine : international journal of phytotherapy and phytopharmacology**, v. 125, p. 155343, mar. 2024.

HUANG, H. et al. Recognition of RNA N6-methyladenosine by IGF2BP proteins enhances mRNA stability and translation. **Nature Cell Biology**, v. 20, n. 3, p. 285–295, 15 fev. 2018.

HUSSAIN, S. et al. NSun2-Mediated Cytosine-5 Methylation of Vault Noncoding RNA Determines Its Processing into Regulatory Small RNAs. **Cell Reports**, v. 4, n. 2, p. 255–261, 1 jul. 2013.

IANNOLO, G. et al. Zika virus infection induces MiR34c expression in glioblastoma stem cells: new perspectives for brain tumor treatments. **Nature**, v. 10, n. 4, 19 mar. 2019.

ISHII, K. et al. Characteristics and clustering of human ribosomal protein genes. **BMC Genomics**, v. 7, n. 1, 28 fev. 2006.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2015. Disponível em: <https://www.scielo.br/j/ramb/a/sy7Wgq3vXfLNJPN7ZtYsqCf/>. Acesso em: 10 jul. 2025.

INCA. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2020: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2019. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/publicacoes/livros/estimativa-2020-incidencia-de-cancer-no-brasil>. Acesso em: 10 jul. 2025.

JAVED, F. et al. Zika virus: what we need to know? **Journal of Basic Microbiology. Wiley**, v. 58, p. 3-16, jan. 2018.

JIA, G. et al. N6-Methyladenosine in nuclear RNA is a major substrate of the obesity-associated FTO. **Nature Chemical Biology**, v. 7, n. 12, p. 885–887, 16 out. 2011.

KAUFMAN, H. L. et al. Oncolytic viruses: A new class of immunotherapy drugs. **Nature Reviews. Cancer Immunotherapy**, v. 14, p. 642-663, set. 2015.

KAO, Y-T., et al. Zika virus cleaves GSDMD to disseminate prognosticable and controllable oncolysis in a human glioblastoma cell model. **Molecular Therapy Oncolytics**, v.28, p.104-117, mar. 2023.

KELLY, E.; RUSSELL, S. J. History of Oncolytic Viruses: Genesis to Genetic Engineering. **Molecular Therapy**, v. 15, n. 4, p. 651–659, fev. 2007.

KLEIHUES, P.; OHGAKI, H. Primary and secondary glioblastomas: From concept to clinical diagnosis. **Neuro-Oncology**, p. 44-51, jan. 1999.

KRETSCHMER, M. et al. Zikavirus prME Envelope Pseudotyped Human Immunodeficiency Virus Type-1 as a Novel Tool for Glioblastoma-Directed Virotherapy. **Cancers**, v. 12, n. 4, p. 1000, 18 abr. 2020.

KO, C. C. et al. Differentiation between glioblastoma multiforme and primary cerebral lymphoma: Additional benefits of quantitative diffusion- Weighted MR imaging. **PLoS ONE**, v. 11, n. 9, p. 1-15, set. 2016.

KOCH, M. S. et al. Uncovering transcriptomic landscape alterations of CAN-2409 in in vitro and in vivo glioma models. **Frontiers in Medicine**, v. 10, p. 1140352, 9 maio 2023.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, abr. 2007.

KURYK, L.; MØLLER, A. Chimeric oncolytic Ad5/3 virus replicates and lyses ovarian cancer cells through desmoglein-2 cell entry receptor. **Journal of Medical Virology**, v. 92, p.1309-1315, jan. 2020.

LEVADITI, C; NICOLAU, S. Vaccine et neoplasms. **Ann. Inst. Pasteur**, v. 37, p. 443-447, 1923

LI, H. et al. Zika virus NS5 protein inhibits cell growth and invasion of glioma. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 516, n. 2, p. 515–520, 1 ago. 2019.

LIMA, E. et al. MALDI imaging detects endogenous digoxin in glioblastoma cells infected by Zika virus—Would it be the oncolytic key? **Journal of Mass Spectrometry**, v. 53, n. 3, p. 257–263, 29 dez. 2017.

LI, M. et al. Characterization of Zika Virus Endocytic Pathways in Human Glioblastoma Cells. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, p. 242, 6 mar. 2020.

LIU, J. et al. A METTL3–METTL14 complex mediates mammalian nuclear RNA N6-adenosine methylation. **Nature Chemical Biology**, v. 10, n. 2, p. 93–95, 6 dez. 2013.

LIU, N. et al. N6-methyladenosine-dependent RNA structural switches regulate RNA–protein interactions. **Nature**, v. 518, n. 7540, p. 560–564, 24 fev. 2015.

LOUIS, D. N. et al. The 2016 World Health Organization Classification of Tumors of the Central Nervous System: a summary. **Acta Neuropathologica. Springer Verlag**, v. 131, p. 803-820, jun. 2016.

LOUIS DN, et al. The 2021 WHO classification of tumors of the central nervous system: a summary. **Neuro Oncol.** v. 23, n. 8, p. 1231–1251, 2021.

LU, C.-Y. et al. The Rescue and Characterization of Recombinant, Microcephaly-Associated Zika Viruses as Single-Round Infectious Particles. **Viruses**, v. 11, n. 11, p. 1005, 31 out. 2019.

LU, K. V. et al. Differential Induction of Glioblastoma Migration and Growth by Two Forms of Pleiotrophin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 280, n. 29, p. 26953–26964, 1 jul. 2005.

MAKINOSHIMA, H. PTPRZ1 regulates calmodulin phosphorylation and tumor progression in small-cell lung carcinoma. **BMC Cancer**, v. 12, n. 537, p.1-10, 2012.

MAO, Z. Q.; MINAKAWA, N.; MOI, M. L. Novel Antiviral Efficacy of *Hedyotis diffusa* and *Artemisia capillaris* Extracts against Dengue Virus, Japanese Encephalitis Virus, and Zika Virus Infection and Immunoregulatory Cytokine Signatures. **Plants**, v. 11, n. 19, p. 2589, 30 set. 2022.

MARINOWIC, D. et al. Epidemiology and outcomes of primary central nervous system tumors in Brazil: 15-year population-based analysis. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 163, p. 139–148, 2024a.

MARINOWIC, D. et al. Influence of Zika virus on the cytotoxicity, cell adhesion, apoptosis and inflammatory markers of glioblastoma cells. **Oncology Letters**, v. 27, n. 4, 28 fev. 2024b.

MARTINEZ-PUENTE et al. Analysis of the heterologous expression, localization, and cellular response to the Zika virus E protein in vitro. **Cellular and Molecular Biology**, v. 70, n. 10, p. 72–82, 24 nov. 2024.

MCKINNON, C. et al. Glioblastoma: clinical presentation, diagnosis, and management. **BMJ**, v. 374, p. n1560, jul. 2021.

MEANS, R. E.; SOUNAK GHOSH ROY; KATZ, S. G. The Propagation and Quantification of Two Emerging Oncolytic Viruses: Vesicular Stomatitis (VSV) and Zika (ZIKV). **Methods in molecular biology**, p. 253–263, 28 nov. 2019.

MEYER, K. D.; JAFFREY, S. R. The dynamic epitranscriptome: N6-methyladenosine and gene expression control. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 15, n. 5, p. 313–326, 9 abr. 2014.

MONTGOMERY, R. I. et al. Herpes Simplex Virus-1 Entry into Cells Mediated by a Novel Member of the TNF/NGF Receptor Family. **Cell**, v. 87, p. 427-436, nov. 1996

MOORE, A. E. Effect of inoculation of the viruses of influenza a and herpes simplex on the growth of transplantable tumors in mice. **Cancer**, v. 2, n. 3, p. 516–524, mai. 1949a.

MOORE, A. E. The destructive effect of the virus of russian far east encephalitis on the transplantable mouse sarcoma 180. **Cancer**, v. 2, n. 3, p. 525–534, mai. 1949b.

MOORE, C. A. et al. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. **JAMA Pediatrics**. American Medical Association, 1 mar. 2017.

MUPPALA, S. Growth Factor-Induced Angiogenesis in Hepatocellular Carcinoma. **Critical Reviews in Oncogenesis**, v. 26, n. 1, p. 61-68, 2021.

NAIR, S. et al. Zika virus oncolytic activity requires CD8⁺ T cells and is boosted by immune checkpoint blockade. **JCI insight**, v. 6, p. 1-15, 2021.

NANDY, A. et al. Current Computer-Aided Drug Design Send Orders for Reprints to reprints@benthamscience.ae Characterizing the Zika Virus Genome-A Bioinformatics Study. **Current Computer-Aided Drug Design**, v. 12, p. 87–97, mar. 2016.

NAKANO, S. et al. NSUN3 methylase initiates 5-formylcytidine biogenesis in human mitochondrial tRNAMet. **Nature Chemical Biology**, v. 12, n. 7, p. 546–551, 23 maio 2016.

NGO, H. et al. Generation of Viral Particles with Brain Cell-Specific Tropism by Pseudotyping HIV-1 with the Zika Virus E Protein. **Methods and protocols**, v. 7, n. 1, p. 3–3, 28 dez. 2023.

NORMAN, S. A. et al. Expression of a receptor protein tyrosine phosphatase in human glial tumors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 36, p. 209–217, 1998.

NOVAES, G. M. et al. Genetically modified ZIKA virus as a microRNA-sensitive oncolytic virus against central nervous system tumors. **Molecular Therapy**, v. 32, n. 2, p. 440–456, 7 fev. 2024.

NOWAKOWSKI, T. J. et al. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 591–596, 31 mar. 2016.

PEREIRA, S. H. et al. Antioxidant and antiviral activity of fullerol against Zika virus. **Acta Tropica**, v. 224, p. 106135–106135, 15 set. 2021.

PÖHLKING, C. et al. Isolation of Cells from Glioblastoma Multiforme Grade 4 Tumors for Infection with Zika Virus prME and ME Pseudotyped HIV-1. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 24, n. 5, p. 4467, 1 jan. 2023.

ROMBI, F. et al. The journey of Zika to the developing brain. **Molecular Biology Reports. Springer**, v. 47, p. 3097–3115, abr. 2020.

ROUNDTREE, I. A. et al. Dynamic RNA modifications in gene expression regulation. **Cell**, v. 169, n. 7, p. 1187–1200, 1 jun. 2017.

ROUTHU, N. et al. Polymeric Prodrugs Targeting Polyamine Metabolism Inhibit Zika Virus Replication. **Molecular Pharmaceutics**, 24 jul. 2018.

SCHERER, H. J. The pathology of cerebral gliomas: A critical review. **J Neurol Psychiatry**, v. 3, n. 2, p. 147–177, abr. 1940.

SCHNEIDER, K. et al. “ToxRTool”, a new tool to assess the reliability of toxicological data. **Toxicology Letters**, v. 189, n. 2, p. 138–144, set. 2009.

SEMENOV, D. V. et al. Transcriptome Changes in Glioma Cells upon Infection with the Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact. **Cells**, v. 12, n. 22, p. 2616, 12 nov. 2023.

SEMENOV, D. et al. Single-Cell Transcriptomic Changes in Patient-Derived Glioma and U87 Glioblastoma Cell Cultures Infected with the Oncolytic Virus VV-GMCSF-Lact. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 26, n. 14, p. 6983, 20 jul. 2025.

SEN, A. et al. Leveraging Allele-Specific Expression for Therapeutic Response Gene Discovery in Glioblastoma. **Cancer Research**, v. 82, n. 3, p. 377–390, 13 dez. 2021.

SHALHOUT, S. Z. et al. Therapy with oncolytic viruses: progress and challenges. **Nature Reviews Clinical Oncology**. **Springer Nature**, v. 20, p. 160-177, mar. 2023.

SHER, A. A.; LAO, Y. T.; COOMBS, K. M. HLA-A, HSPA5, IGFBP5 and PSMA2 Are Restriction Factors for Zika Virus Growth in Astrocytic Cells. **Viruses**, v. 15, n. 1, p. 97–97, 29 dez. 2022.

SHRIVASTAVA, S. et al. Whole genome sequencing, variant analysis, phylogenetics, and deep sequencing of Zika virus strains. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1-11, dez. 2018.

SIROHI, D. et al. The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. **Structural Biology**. v. 232, n. 6284, p. 467-470, abr. 2016

SIROHI, D.; KUHN, R. J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. s10, p. 935-944, 2017.

SLAVOV, S. N. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. 1-11, abr. 2016.

SOUTHAM, C. et al. Homotransplantation of Human Cell Lines. v. 125, p. 158-160, 1957.

SOUZA, F. et al. Incidência de tumores malignos do sistema nervoso central no Brasil: análise de 23 Registros Populacionais de Câncer, 2000 a 2015. **Arquivos de Neuro-Psiquiatria**, v. 81, n. 1, p. 1–8, 2023.

SRIVASTAVA, M. et al. Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. **Nature Communications**, v. 11, p. 3896, 4 ago. 2020.

STOYANOV, G. S.; DZHENKOV, D. L. On the Concepts and History of Glioblastoma Multiforme - Morphology, Genetics and Epigenetics. **Folia medica**, v. 60, n. 1, p. 48–66, mar. 2018.

STUPP, R. et al. Effects of radiotherapy with concomitant and adjuvant temozolomide versus radiotherapy alone on survival in glioblastoma in a randomised phase III study: 5-year analysis **The Lancet. Oncology**, v. 10, p. 459-466, mai. 2009.

SU, K. Y.; BALASUBRAMANIAM, V. R. M. T. Zika Virus as Oncolytic Therapy for Brain Cancer: Myth or Reality? **Frontiers in Microbiology**, v. 10, n. 2715, p. 1-8, nov. 2019.

SVYATCHENKO, V. A. et al. Zika virus has an oncolytic activity against human glioblastoma U87 cells. **Vavilov Journal of Genetics and Breeding**, v. 22, n. 8, p. 1040–1045, 3 jan. 2019.

TOMKO, R. P. et al. HCAR and MCAR: The human and mouse cellular receptors for subgroup C adenoviruses and group B coxsackieviruses. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 94, p. 3352–3356, abr. 1997.

TRUS, I. et al. Zika Virus with Increased CpG Dinucleotide Frequencies Shows Oncolytic Activity in Glioblastoma Stem Cells. **Viruses**, v. 12, n. 5, p. 579, 25 maio 2020.

VALDEZ, F. et al. Schlafen 11 Restricts Flavivirus Replication. **Journal of Virology**, v. 93, n. 15, 1 ago. 2019.

WALES-MCGRATH, B. et al. Changes in ADAR RNA editing patterns in CMV and ZIKV congenital infections. **BMC Genomics**. v. 24, n. 685, p. 1-23, 2023.

WALKLEY, C. R.; LI, J. B. Rewriting the transcriptome: adenosine-to-inosine RNA editing by ADARs. **Genome Biology**, v. 18, n. 1, p. 205, 30 out. 2017.

VICTORIO, C. et al. Repurposing of Zika virus live-attenuated vaccine (ZIKV-LAV) strains as oncolytic viruses targeting human glioblastoma multiforme cells. **Journal of Translational Medicine**, v. 22, n. 1, 2 fev. 2024.

VLASOVA-ST. LOUIS, I.; BOHJANEN, P. R. Post-transcriptional regulation of cytokine and growth factor signaling in cancer. Cytokine and Growth Factor Reviews. **Elsevier Ltd**, v. 33, p. 83–93, fev. 2017.

WANG, S. et al. Integrin $\alpha\beta 5$ Internalizes Zika Virus during Neural Stem Cells Infection and Provides a Promising Target for Antiviral Therapy. **Cell Reports**, v. 30, n. 4, p. 969-983.e4, 28 jan. 2020.

WANG, X. et al. N6-methyladenosine-dependent regulation of messenger RNA stability. **Nature**, v. 505, n. 7481, p. 117–120, 26 nov. 2013.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85(2), n. 328, p. 1-36, fev. 2010.

WEN, P. Y. et al. Medical management of patients with brain tumors. **Journal of Neuro-Oncology**, v. 80, p. 313–332, dez. 2006.

WEN, P. Y.; KESARI, S. Medical Progress Malignant Gliomas in Adults. **N Engl J Med**. v. 359, n. 5, p. 492-507, jul. 2008.

WIELAND, J. et al. Zika virus replication in glioblastoma cells: electron microscopic tomography shows 3D arrangement of endoplasmic reticulum, replication organelles, and viral ribonucleoproteins. **Histochemistry and Cell Biology**, 12 set. 2021.

XIAO, J. et al. CDK4/6 Inhibition Enhances Oncolytic Virus Efficacy by Potentiating Tumor-Selective Cell Killing and T-cell Activation in Refractory Glioblastoma. **Cancer research**, v. 82, n. 18, p. 3359–3374, 6 jul. 2022.

XU, H. et al. High-Throughput Screening Identifies Mixed-Lineage Kinase 3 as a Key Host Regulatory Factor in Zika Virus Infection. **Journal of Virology**, v. 93, n. 18, 15 set. 2019.

XU, M-M. et al. Hemin protects against Zika virus infection by disrupting virus-endosome fusion. **Antiviral Research**, v. 203, p.1-11. mai. 2022.

YANG, P et al. IDH mutation and MGMT promoter methylation in glioblastoma: Results of a prospective registry. **Oncotarget** v. 6, p. 40896–40906, 2015.

YANG, S. et al. Zika Virus-Induced Neuronal Apoptosis via Increased Mitochondrial Fragmentation. **Frontiers in Microbiology**, v. 11, 23 dez. 2020.

YUAN, F. et al. Roles of the M6A modification of RNA in the glioblastoma microenvironment as revealed by Single-Cell analyses. **Frontiers in Immunology**, v. 13, p. 798583, 26 abr. 2022.

ZADRA, N. et al. Comprehensive phylogenomic analysis of Zika virus: Insights into its origin, past evolutionary dynamics, and global spread. **Virus Research**, v. 350, p. 199490, 8 nov. 2024.

ZHANG, Y.; ZHANG, Z. The history and advances in cancer immunotherapy: understanding the characteristics of tumor-infiltrating immune cells and their therapeutic implications. **Cellular and Molecular Immunology**. Springer Nature, v. 17, p. 807–821, ago. 2020.

ZHENG, G. et al. ALKBH5 Is a Mammalian RNA Demethylase that Impacts RNA Metabolism and Mouse Fertility. **Molecular Cell**, v. 49, n. 1, p. 18–29, 21 nov. 2012.

ZHOU, L. et al. Identification of Ascomycin against Zika virus infection through screening of natural product library. **Antiviral Research**, v. 196, p. 105210, 1 dez. 2021.

ZHU, Z. et al. Zika virus has oncolytic activity against glioblastoma stem cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 214, n. 10, p. 2843–2857, 2017.

ZHU, Z. et al. Zika Virus Targets Glioblastoma Stem Cells through a SOX2-Integrin $\alpha\beta 5$ Axis. **Cell. Stem Cell**, v. 26, n. 2, p. 187–204.e10, fev. 2020.

ZUPIN, L. et al. Photobiomodulation therapy reduces viral load and cell death in ZIKV-infected glioblastoma cell line. **Lasers in Medical Science**, v. 33, n. 9, p. 2011–2013, 3 jul. 2018.

ZWERNIK, S. D. et al. AXL receptor is required for Zika virus strain MR-766 infection in human glioblastoma cell lines. **Molecular Therapy - Oncolytics**, v. 23, p. 447–457, 17 dez. 2021.

Anexo I – Metodologia e protocolo dos experimentos realizados nos Capítulos 2 e 3

Crescimento e estoque do ZIKV

As células escolhidas para replicação e titulação viral pertencem à linhagem imortalizada Vero-CCL81, oriunda de células primárias isoladas de tecido renal de um símio da espécie *Chlorocebus aethiops* em 1962, sendo indicada para crescimento de estoques virais com finalidades diversas em biotecnologia (ATCC, 2024). Um criotubo com capacidade para 1,8mL (Corning #430659) contendo aproximadamente 1mL desta linhagem armazenada em solução de congelamento, que consiste em 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) (Sigma-Aldrich #D8418) em Soro Fetal Bovino (SFB) (Gibco #12657-029), foi descongelado e centrifugado (1600rpm x 8 min) a temperatura ambiente para precipitar as células. Após o descarte do sobrenadante, o pellet de células foi ressuspensionado em 1 mL de meio de cultivo recém preparado, que consiste em 10% de SFB em meio DMEM de baixa glicose (Gibco #11885-084). As células foram transferidas para uma garrafa para cultivo celular de 25cm³ de área (Corning #430168) contendo 7mL deste mesmo meio de cultivo recém-preparado, totalizando 8mL de células em meio de cultivo, que foram homogeneizados para distribuir as células de maneira adequada. A garrafa foi cultivada por 2 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após as atingirem a confluência de 100%, as células passaram por repique conforme o seguinte protocolo: 8mL do meio de cultivo foram descartados em um recipiente para descarte de líquidos apropriado. Em seguida, o fundo da garrafa foi lavado com 3mL de PBS 1X (Gibco #20012-043) a temperatura ambiente. Posteriormente, as células foram desprendidas do fundo da garrafa adicionando 3mL de uma solução de tripsina a 0,25% em ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) (Gibco #25200-056) e deixando a garrafa com a tampa rosqueada a 3 minutos na estufa a 37°C com 5% de CO₂. Após o desprendimento, a ação da tripsina foi interrompida por meio da adição e homogeneização de 6mL de meio de cultivo recém-preparado. Por fim, as células foram distribuídas igualmente em duas garrafas de 75cm² de área, que posteriormente receberam 7,5mL de meio de cultivo recém-preparado, totalizando 12mL de células em meio de cultivo em cada garrafa. A solução foi homogeneizada para distribuir as células de maneira adequada. As garrafas foram cultivadas por 3 dias em estufa a 37°C com 5% de CO₂, até que atingissem a confluência de 100%, ponto que corresponde à quantidade ideal de células para experimentos de infecção viral.

A fim de isolar o efeito das variações genéticas do vírus mantendo a uniformidade dos métodos experimentais, optamos por utilizar uma linhagem de ZIKV - ZIKV-PE/243 - isolada

no estado de Pernambuco (DONALD et al., 2016), uma vez que o mesmo faz fronteira com o estado da Paraíba, de onde foi cadastrada uma grande parte dos pacientes incluídos no estudo de Aguiar e colaboradores, que deu base para o nosso interesse na investigação do papel do receptor *PTPRZI* em células de GBM na infecção por ZIKV (AGUIAR et al., 2020).

Um criotubo contendo aproximadamente 1mL de ZIKV armazenado em solução de congelamento foi descongelado e homogeneizado com 11mL meio de manutenção recém preparado, que consiste em 2% de SFB em meio DMEM de baixa glicose, totalizando 12mL de ZIKV em meio de manutenção, que foi armazenado temporariamente em um tubo graduado com capacidade para 15mL (Corning #430791). O fundo da garrafa foi lavado com 3mL de PBS 1X a temperatura ambiente. Em seguida, os 12mL de ZIKV em meio de manutenção foram adicionados à garrafa, que foi mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂. Diariamente, a garrafa contendo as células infectadas foi observada até que fosse notado efeito citopático significativo, mas sem que houvesse desprendimento das mesmas do fundo da garrafa (~4 dias), condições ideais para a titulação do vírus. Concomitantemente, a garrafa com células não-infectadas foi mantida com trocas de meio de cultivo e repiques, quando necessários, conforme descrito anteriormente (observando as proporções necessárias de volumes dos reagentes para garrafas de diferentes áreas).

Para realizar a titulação do vírus as células foram plaqueadas no dia anterior segundo o seguinte protocolo: as células não-infectadas foram desprendidas do fundo da garrafa por meio de tripsinização (adição de tripsina), conforme descrito anteriormente (observando as proporções necessárias de volumes dos reagentes para garrafas de diferentes áreas), sendo em seguida armazenadas em dois tubos graduados com capacidade para 15mL. Os tubos foram centrifugados (1600rpm x 8 min) a temperatura ambiente para precipitar as células, que foram em seguida homogeneizadas com 1mL de meio DMEM de baixa glicose sem adição de SFB (meio mínimo). Para realizar a contagem das células, um volume de 5µL da solução recém homogeneizada foi corado a partir da homogeneização com 195µL da solução de azul de Tripán (Gibco #15250061) a 0,2% em PBS 1X. Em seguida um volume de 10µL da solução de células coradas foi pipetado na cavidade da câmara de Neubauer. O número de células por mL de solução foi estimado tirando a média da contagem absoluta das células nos quatro quadrantes da câmara e multiplicando por 40000 (fator de diluição na solução de azul de Tripán multiplicado pelo fator de correção da câmara). Com base neste cálculo, foi preparado o meio de plaqueamento para placas de 24 poços transparentes (Corning #3526) que consiste no volume correspondente a $2,5 \times 10^6$ células diluído no meio de cultivo recém preparado (10%

SFB em DMEM baixa glicose), totalizando 12,5mL. Finalmente, foram adicionados 500µL desta solução em cada poço, resultando num total de 1×10^5 células por poço.

Após 24h do plaqueamento, os poços da placa foram avaliados quanto à confluência antes da titulação do ZIKV, que foi executada de acordo com o seguinte procedimento: primeiro, o sobrenadante da garrafa contendo as células infectadas foi coletado e armazenado em um tubo graduado de 15mL. Em seguida, de três em três poços, o volume líquido da placa de titulação foi descartado e imediatamente substituído por 100µL do sobrenadante viral coletado da garrafa infectada para evitar o ressecamento das células. A placa foi incubada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 1h para a adsorção do vírus nas células. Durante este processo a placa foi levemente agitada a cada 15 minutos, para garantir uma adsorção uniforme. Terminada a adsorção, de três em três poços, o volume líquido da placa de titulação foi descartado e imediatamente substituído por 500µL de meio de titulação recém-preparado – 0,8% de carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich #C4888) diluído em meio de manutenção (2% SFB em DMEM baixa glicose) para evitar o ressecamento das células. A placa foi mantida em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 4 dias, sendo acompanhada diariamente quanto ao status do efeito citopático em cada poço. Após este período, de três em três poços, o volume líquido da placa de titulação foi descartado e imediatamente substituído por 500µL de paraformaldeído 4% em PBS 1X (Merck #158127-100G), para evitar o ressecamento das células. Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente da noite para o dia no processo de fixação. Finalmente, o volume de formaldeído das placas foi descartado e substituído pela solução de cristal violeta para coloração de placas de cultivo recém-preparada, consistindo em 5% de cristal violeta (Sigma-Aldrich #C0775), 1,7% de NaCl (Merck #106404), 3,3% de paraformaldeído 4% em PBS 1X (Merck #158127-100G) em 33,3% de etanol (Synth #A108411BJ), sendo mantida por 1h a temperatura ambiente. Cuidadosamente, o corante foi removido após este período. Sequencialmente, as placas foram lavadas 3 vezes por submersão em um recipiente com água, sendo em seguida mantidas abertas, para permitir a secagem. Por fim, o título viral foi aferido tirando a média da contagem absoluta das unidades formadoras de placa (PFUs) - que se destacam como pontos transparentes no fundo de cor roxa - em cada um dos 24 poços. Esse valor foi multiplicando por 2, uma vez que volume de ZIKV utilizado para infectar cada poço foi de 500µL e a unidade em que o título é apresentado é de PFUs/mL.

Cultivo da linhagem celular de GBM

Com base no que foi indicado por Means e colaboradores em 2019 para pesquisas sobre o efeito oncolítico de ZIKV em GBM, optamos por trabalhar a linhagem celular imortalizada U-87MG, oriunda de células primárias isoladas de um glioblastoma de uma paciente de 44 anos do sexo feminino em 1966 em um hospital universitário da Suécia (MEANS et al, 2019). As células foram cultivadas conforme procedimento quase idêntico ao cultivo da linhagem Vero-CCL81 descrito no tópico anterior, com a diferença principal residindo na concentração da solução de tripsina-EDTA utilizada, que no caso desta linhagem é de 0,125%, metade da concentração utilizada para desprender células Vero. Além disto, o ritmo de crescimento entre as duas linhagens foi variável. Assim, as células da linhagem U87-MG foram cultivadas até que fosse observado 100% de confluência em garrafas de cultivo de 75cm² de área, ponto que corresponde à quantidade ideal de células para os experimentos de infecção viral discutidos neste trabalho.

Definição da MOI de trabalho

Para conduzir experimentos que envolvem a infecção de um dado vírus em determinada linhagem celular é necessário definir o número de partículas virais por célula (MOI) considerando os seguintes atributos: a curva de crescimento viral, a capacidade de infectar pelo menos 50% das células e a viabilidade celular. Para tanto, três experimentos foram conduzidos em paralelo: um ensaio de viabilidade celular com aferições em diferentes tempos e MOIs; um experimento de cinética viral com aferições em diferentes tempos e MOIs; um ensaio de infectividade percentual com aferições em diferentes MOIs em 72h pós-infecção. Nos três casos, o protocolo utilizado no plaqueamento das células foi idêntico ao que foi descrito no tópico anterior, variando as quantidades de células e volumes líquidos em cada caso: para o ensaio de viabilidade, em cada um dos 48 poços de uma placa de 96 poços preta (Corning #3603) utilizados foram adicionados 80μL de meio de cultivo contendo 5×10^4 células. Para o experimento de cinética viral, em cada um dos 12 poços de uma placa de 24 poços transparentes utilizados foram adicionados 500μL de meio de cultivo contendo $2,5 \times 10^5$ células. Para o experimento de infectividade percentual, em cada um dos 12 poços de uma placa de 96 poços preta utilizados foram adicionados 80μL de meio de cultivo contendo 5×10^4 células. Após 24h, as três placas foram infectadas conforme os desenhos experimentais: A placa de viabilidade foi infectada adicionando 30μL de ZIKV em meio DMEM baixa glicose (meio 0%) por poço em 4 triplicatas para cada MOI - controle negativo (mock), 0,001, 0,036, 0,073 e 0,363 -, referentes aos 4 pontos de aferição no tempo (0h, 24h, 48h e 72h), totalizando 48 poços

infectados. A placa de cinética viral e a placa de infectividade percentual foram infectadas com, respectivamente, 100 μ L e 30 μ L de ZIKV em meio mínimo por poço em 1 triplicata para cada MOI - controle negativo (mock), 0,001, 0,036, 0,073 e 0,363. Após a infecção, o sobrenadante viral foi retirado e em seguida foram adicionados 80 μ L, 500 μ L e 80 μ L de meio de manutenção em cada poço das placas referentes aos experimentos de viabilidade, cinética e infectividade percentual, respectivamente.

Ensaio de viabilidade celular

O ensaio de viabilidade foi executado utilizando o reagente resazurina - CellTiter-Blue® Cell Viability Assay (Promega #G8080) - conforme o protocolo estabelecido: em cada um dos pontos de medição no tempo: 0h, 24h, 48h e 72h, uma alíquota do reagente foi descongelada em banho-seco ajustado em 37°C, sendo protegida da luz até que atingisse a temperatura ambiente. Em seguida, 20 μ L do reagente foram adicionados em cada poço da placa separado para aquele ponto de medição conforme mostrado na Fig. 6A. Em seguida, a placa foi agitada por 10 segundos e incubada em estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 1h. Finalmente, a placa foi agitada por 10 segundos e encaminhada para leitura de fluorescência em aparelho Varioskan Lux com leitor ajustado para comprimentos de onda de 560-590nm. Os valores de unidade relativa de fluorescência (URF) registrados pelo aparelho foram armazenados em tabela para processamento e análise de dados posterior. Ao final das 72h de experimentação, os dados armazenados foram normalizados da seguinte forma: O valor em URF de cada uma das triplicatas obtido para as diferentes MOIs em cada ponto no tempo foi dividido pela média das triplicatas correspondentes do controle negativo (Mock), de modo a normalizar as medições. Os cálculos foram realizados por meio das funções de base do *software* R v.4.3.2, com auxílio do pacote '*readxl*' para o gerenciamento de arquivos e dos pacotes '*ggplot2*' e '*scales*' para representações gráficas (R CORE TEAM, 2021; WICKHAM, 2016; WICKHAM & BRYAN, 2023; WICKHAM et al, 2023).

Ensaio de cinética da replicação viral

Para o ensaio de cinética viral foram coletados 200 μ L do sobrenadante em cada poço nos diferentes pontos de medição no tempo: 0h, 24h, 48h e 72h. Nos tempos de 0h, 24h e 48h foram adicionados 200 μ L de meio de manutenção em cada poço imediatamente após a coleta das amostras, a fim de restaurar o volume total por poço (500 μ L), propiciando a continuidade

do ensaio. O volume líquido coletado foi armazenado em tubos com capacidade para 1,5mL (Kasvi #K6-150) devidamente identificados, que foram armazenados em ultrafreezer a -80°C para processamento posterior. Ao final das 72h de coleta, as 48 amostras foram encaminhadas para o procedimento de extração de RNA a partir dos reagentes do kit PureLink RNA Minikit (Invitrogen # 12183025) conforme o protocolo estabelecido. Em lotes de 18, as amostras foram descongeladas e processadas da seguinte maneira: em cada tubo, foram pipetados 200µL de reagente de lise recém-preparado, que consiste em 1% de β-mercaptoetanol (NEON #02826) diluído em tampão de lise fornecido pelo kit. Em seguida, 200µL de etanol absoluto foram pipetados na mistura, sendo homogeneizados com 5 pipetagens. Os 600µL da mistura foram transferidos para colunas com tubos coletores identificadas com o código de cada amostra, que foram centrifugadas (12000G x 15 segundos) a temperatura ambiente. O líquido filtrado presente no tubo coletor de cada amostra foi descartado e as colunas correspondentes foram recolocadas no mesmo tubo. Em seguida, 700µL do reagente ‘tampão de lavagem I’ incluso no kit foram pipetados em cada uma das colunas, que foram centrifugadas (12000G x 15 segundos) a temperatura ambiente. Posteriormente, o tubo coletor de cada coluna foi descartado e substituído por outro tubo coletor fornecido pelo kit. Em seguida, 500µL do reagente ‘tampão de lavagem II’ incluso no kit foram pipetados em cada uma das colunas, que foram centrifugadas (12000G x 15 segundos) a temperatura ambiente. O líquido filtrado presente no tubo coletor de cada amostra foi descartado e as colunas correspondentes foram recolocadas no mesmo tubo. Novamente, 500µL do reagente ‘tampão de lavagem II’ incluso no kit foram pipetados em cada uma das colunas, que foram centrifugadas (12000G x 15 segundos) a temperatura ambiente. O líquido filtrado presente no tubo coletor de cada amostra foi descartado e as colunas correspondentes foram recolocadas no mesmo tubo. Os conjuntos de coluna e tubos coletores vazios foram então centrifugados (12000G x 1 minuto) a temperatura ambiente. Em seguida, os tubos coletores foram descartados e as colunas foram inseridas em um tubo convencional com capacidade para 1,5mL identificado com o código de cada amostra. Por fim, 30µL de água livre de nuclease foram adicionados diretamente na malha de cada uma das colunas, que foram incubadas por 1 minuto a temperatura ambiente e em seguida centrifugadas juntamente com os tubos (12000G x 2 minutos) a temperatura ambiente.

A carga viral do ZIKV foi quantificada a partir das amostras de RNA extraído em ensaio de retrotranscrição seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR) que incluiu uma curva padrão (triplicatas em 6 pontos: de 1×10^6 a 1×10^1) construída através da diluição seriada de uma amostra de RNA do ZIKV extraída anteriormente (através do mesmo kit pelo mesmo protocolo) estimando o número de cópias por mL a partir do título viral. A

reação de RT-qPCR foi executada utilizando os reagentes do kit molecular ZC D-tipagem (Bio-Manguinhos), conforme o protocolo especificado: primeiro, o cálculo das quantidades dos reagentes da mistura para a reação de PCR foi realizado multiplicando o número de amostras pelo volume de cada reagente por amostra (3,75µL de mix de PCR e 1,25µL de mix de iniciadores diretos, reversos e sondas fluorescentes). O cálculo considerou uma perda volumétrica de 10% do total da reação, devido à viscosidade dos reagentes. Após o cálculo, a mistura para PCR foi preparada, sendo distribuída nos poços designados em uma placa óptica de 96 poços para PCR em tempo real (Applied Biosystems #N8010560). Em seguida, 5µL de cada amostra de RNA foram pipetados e homogeneizados simultaneamente em cada poço, totalizando um volume de reação de 10µL. Por fim, a placa foi selada com selante óptico para PCR em tempo real (Axygen #UC-500), centrifugada por 15 segundos e encaminhada para a corrida em instrumento termociclador para PCR em tempo real, de acordo com o seguinte programa: transcrição reversa a 50°C por 30 minutos, ativação da DNA polimerase a 95°C por 3 minutos, e 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) seguida de anelamento e extensão (60°C por 50 segundos), com o volume total de reação ajustado em 15µL e a temperatura da cobertura superior em 105°C, para evitar a perda de volume da reação por evaporação. Ao fim da corrida, os valores de carga viral estimados pela curva padrão foram extraídos e armazenados em tabela para processamento e análise de dados posterior. As curvas de crescimento do ZIKV foram estimadas para cada MOI, através de modelos que melhor acomodaram os dados em cada caso, utilizando as funções base do *software* R v.4.3.3, com auxílio do pacote '*readxl*' para o gerenciamento de arquivos e do pacote '*ggplot2*' para as representações gráficas (R CORE TEAM, 2021; WICKHAM, 2016; WICKHAM & BRYAN, 2023).

Ensaio de infectividade

Para a verificação da infectividade nas diferentes MOIs, foi realizado um ensaio de imunofluorescência com anticorpos contra a proteína envelope do ZIKV após 72h de infecção, de acordo com o seguinte procedimento: de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e substituído por 200µL de paraformaldeído 4% em PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. Em seguida, a placa foi incubada a temperatura ambiente por 15 minutos no processo de fixação. Após este passo, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e lavado com 200µL de PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. Em seguida, de três em três, o volume líquido dos poços foi substituído por 100µL da solução de

Triton 1%, que consiste no reagente Triton X-100 (Bio-Rad #1610407) diluído a 1% em PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. Após este passo, a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente propiciando a permeabilização da membrana celular. Após a permeabilização, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e lavado com 200µL de PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. Para bloquear as ligações imunológicas inespecíficas, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e substituído por 50µL da solução de bloqueio DS-PBS 5%, que consiste em de soro de burro (Sigma-Aldrich #S30-M) diluído a 5% em PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. A placa foi incubada por 1h a temperatura ambiente, propiciando o bloqueio das reações inespecíficas. Durante este processo a placa foi levemente agitada a cada 15 minutos, para garantir um bloqueio uniforme. Após o bloqueio, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e substituído por 50µL da solução contendo os anticorpos primários produzidos em camundongo contra a proteína NS1 de Flavivirus (abcam #ab214337), diluídos na proporção 1:200 em DS-PBS, para evitar o ressecamento das células. A placa foi incubada por 1h a 37°C, propiciando a ligação imunológica. Durante este processo a placa foi levemente agitada a cada 15 minutos, para garantir uma ligação imunológica uniforme. Após a ligação com anticorpos primários, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e lavado com 200µL de PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. Em seguida, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e substituído por 50µL da solução contendo os anticorpos secundários contra o domínio constante de camundongo Alexa Fluor 488 donkey anti-mouse IgG (H+L) (Invitrogen #A21202), diluídos na proporção 1:1000 em DS-PBS, para evitar o ressecamento das células. A placa foi protegida da luz e incubada por 2h a 37°C, propiciando a ligação imunológica. Após a ligação do anticorpo secundário, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e lavado com 200µL de PBS 1X, para evitar o ressecamento das células. Em seguida, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e substituído por 50µL do reagente para coloração de núcleos DAPI (Sigma-Aldrich #D8417) diluído a 300nM em PBS 1X. Para propiciar a coloração dos núcleos, a placa foi incubada por 15 minutos a temperatura ambiente. Finalmente, de três em três, o volume líquido dos poços foi descartado e substituído por 100µL de PBS 1X, para evitar o ressecamento das células.

Ao fim do protocolo de marcação com imunofluorescência, a placa de 96 poços foi levada ao abrigo da luz para o microscópio de fluorescência para a coleta de dados visando a determinação da infectividade na objetiva com fator de ampliação de 60x, que se deu da seguinte maneira: Para cada MOI, 10 campos foram selecionados para a contagem

comparativa, isto é, contagem do número absoluto de células infectadas e de células totais no mesmo campo. Os 10 campos foram fracionados da seguinte maneira: 4 campos selecionados no poço da triplicata 1, 3 campos selecionados no poço da triplicata 2 e 3 campos selecionados no poço da triplicata 3. A seleção dos campos levou em conta a topologia das células cultivadas em cada poço, uma vez que culturas de gliomas tendem a se aglomerar, sobrepondo-se em estruturas tridimensionais, que pelo contato célula-célula, podem acabar beneficiando a infectividade nestes pontos em comparação com campos onde as células estão mais espalhadas. Para minimizar esse potencial viés, os 10 campos selecionados corresponderam aos campos com maior número absoluto células infectadas em todas as MOIs e triplicatas, de modo a uniformizar os resultados. A contagem das marcações das células se deu através do *software* de análise de imagens do microscópio de fluorescência: Os núcleos marcados com DAPI e GFP, que representam o número absoluto de células totais e o número de células infectadas, respectivamente, foram contados automaticamente através do algoritmo de inteligência artificial do próprio *software*, com ajuste manual dos parâmetros: intensidade, circularidade e área. As fotografias contendo os valores de contagem foram exportadas e transcritas em tabela para processamento e análise de dados posterior. Em seguida, a infectividade foi calculada dividindo o número absoluto de células infectadas pelo número absoluto de células totais em cada campo. A mediana, primeiro e terceiro quartis dos valores de infectividade percentual para cada MOI em 72h pós-infecção foram calculados utilizando as funções base do *software* R v.4.3.3, com auxílio do pacote '*readxl*' para o gerenciamento de arquivos e dos pacotes '*ggplot2*', '*scales*', '*png*' e '*ggpubr*' para as representações gráficas (KASSAMBARA, 2023; R CORE TEAM, 2021; URBANEK, 2022; WICKHAM, 2016; WICKHAM & BRYAN, 2023; WICKHAM et al, 2023). Por fim, os resultados dos três ensaios foram comparados e analisados, permitindo a definição da MOI ótima para os experimentos de infecção de ZIKV em GBMs, necessários aos objetivos deste trabalho.

Avaliação da expressão do gene PTPRZ1 em células infectadas com ZIKV

Para avaliar a evolução da expressão do gene PTPRZ1 em células de GBM durante uma infecção por ZIKV, foi conduzido um experimento de cinética do crescimento viral semelhante ao anterior pareado a um experimento de cinética dos níveis de expressão do gene PTPRZ1. Para tanto, as células foram plaqueadas em todos os poços de uma placa de 24 poços transparente. A quantidade de células por poço e o protocolo de plaqueamento utilizados foram idênticos aos descritos anteriormente para uma placa com este número de poços. Os poços

designados para infecção foram infectados 24h após o plaqueamento com a MOI definida de acordo com o protocolo de infecção idêntico ao descrito anteriormente. O desenho do experimento incluiu triplicatas para cada ponto de aferição no tempo (0h, 24h, 48h e 72h) (Fig. 7). A coleta foi executada da seguinte maneira: para cada ponto de aferição no tempo, 250µL de sobrenadante foram coletados e armazenados em tubos devidamente identificados para o ensaio de cinética viral. Logo após a coleta do sobrenadante, as células foram desprendidas de cada poço através de atrito com a ponteira no fundo da placa. Em seguida, os 250µL de células lisadas em meio de manutenção foram armazenados em tubos devidamente identificados para o ensaio de expressão. Ao término da coleta de ambos os materiais, todas as amostras eram armazenadas em ultrafreezer a -80°C até que fossem completadas as 72h de execução do experimento.

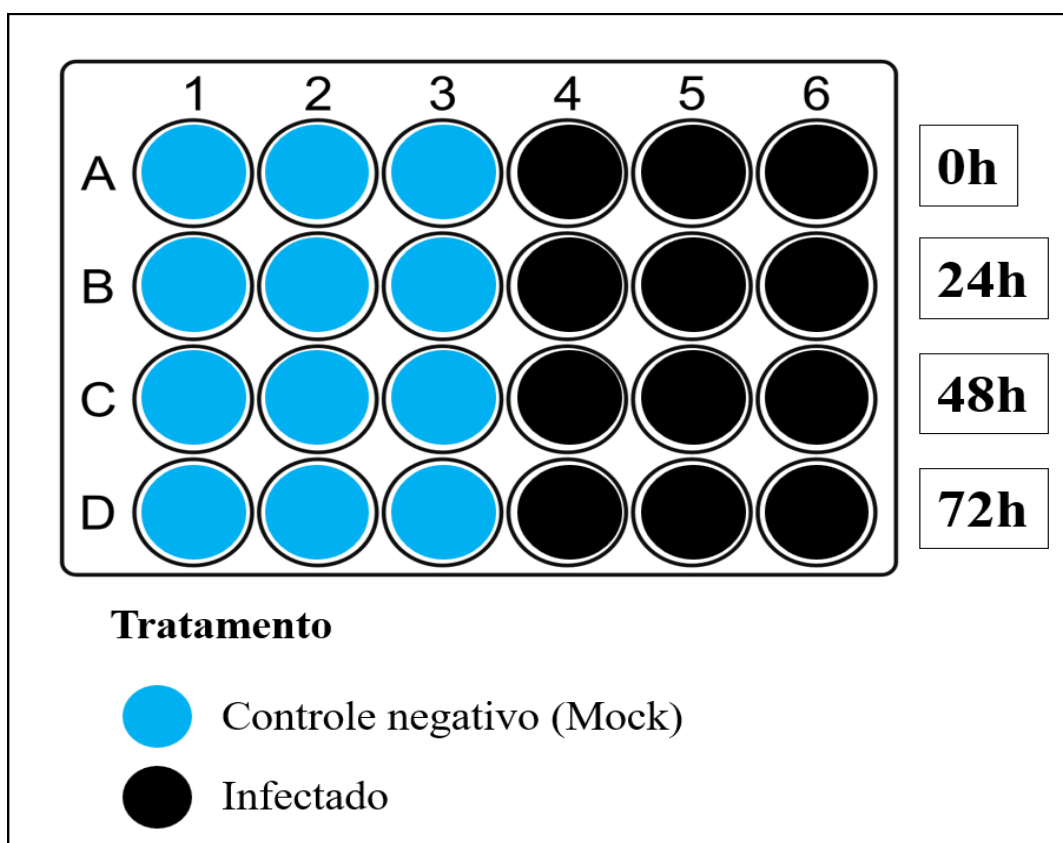


Figura 7. Desenho dos experimentos de cinética e expressão na MOI definida. Desenho experimental para averiguação simultânea do crescimento do ZIKV e da expressão do gene *PTPRZI*. Os diferentes tratamentos dos poços na placa estão representados pelas cores: mock (azul claro) e infectado (preto).

A extração de todas as amostras foi executada através de kit e protocolo idênticos aos descritos anteriormente. A carga viral do ZIKV foi quantificada a partir das amostras de RNA extraído em ensaio de RT-qPCR, através de kit e protocolo idênticos aos descritos

anteriormente. Os níveis de expressão do *PTPRZI* foram quantificados a partir das amostras de RNA extraído de acordo com o seguinte procedimento: A normalização das amostras foi executada em duas etapas. Para normalizar a partir do RNA total, as amostras foram dosadas por fluorimetria utilizando o kit Qubit RNA HS Assay Kit (Invitrogen #Q32855), de acordo com o protocolo especificado: primeiro, o cálculo das quantidades dos reagentes da mistura para a reação de fluorimetria foi preparado multiplicando o número de amostras pelo volume de cada reagente por amostra (198µL de tampão e 1µL do agente intercalante). O cálculo considerou uma perda volumétrica de 10% do total da reação, devido à viscosidade dos reagentes. Após o cálculo, a mistura para quantificação foi preparada em tubo com capacidade para 15mL protegido da luz por papel alumínio. A mistura foi distribuída em tubos ópticos com capacidade para 0,5mL (Invitrogen #Q32856) devidamente identificados. Em seguida, 1µL de cada amostra foi pipetado nos tubos correspondentes, de acordo com a identificação. Os tubos foram agitados através de vórtex, e mantidos no ao abrigo da luz por 2 minutos sendo, por fim, encaminhados para leitura em aparelho fluorímetro. Os resultados da quantificação foram utilizados para normalizar as amostras através de diluição com água livre de nuclease (Ludwig Biotecnologia), levando em conta o valor menos concentrado.

Finalmente, os níveis de *PTPRZI* foram quantificados por meio de um ensaio de RT-qPCR através de duas reações separadas acomodadas em uma mesma placa de 96 poços óptica para PCR, que tinham como alvos de interesse o gene *PTPRZI* e o gene constitutivo *GAPDH*, que foi utilizado como controle normalizador da expressão. A sequência dos iniciadores direto, reverso e sonda (IDT) utilizados para quantificar a expressão do gene *PTPRZI* foram, respectivamente:

5'-CAGACTACATCAATGCCTCTAT-3', 5'-
CCATATCATCCTCCAGAAATCCT-3' e 5'-/56-
FAM/TCATCATTA/ZEN/CCCAGCACCCTCTCCT/3IABkFQ/-3'. Para o gene *GAPDH*, as sequências correspondentes a esses iniciadores não são conhecidas. A reação de RT-qPCR foi executada utilizando os reagentes do kit iTaq Universal Probes OneStep Kit (Bio-Rad #1725141), conforme o protocolo especificado: Primeiro, o cálculo das quantidades dos reagentes da mistura para as reações de PCR foi realizado multiplicando o número de amostras pelo volume de cada reagente por amostra (5µL de mix de PCR, 0,5µL de mix de iniciadores diretos, reversos e sondas fluorescentes e 0,25µL da enzima transcriptase reversa). O cálculo considerou uma perda volumétrica de 10% do total da reação, devido à viscosidade dos reagentes. Após o cálculo, a mistura para PCR foi preparada, sendo distribuída nos poços designados em uma placa óptica de 96 poços para PCR em tempo real. Em seguida, 4,25µL de cada amostra de RNA foram pipetados e homogeneizados simultaneamente em cada poço,

totalizando um volume de reação de 10µL. Por fim, a placa foi selada com selante óptico para PCR em tempo real, centrifugada por 15 segundos e encaminhada para a corrida em instrumento termociclador para PCR em tempo real, de acordo com o seguinte programa: transcrição reversa a 50°C por 10 minutos, ativação da DNA polimerase a 95°C por 3 minutos, e 40 ciclos de desnaturação (95°C por 15 segundos) seguida de anelamento (55°C por 30 segundos) e extensão (60°C por 30 segundos), com o volume total de reação ajustado em 15µL e a temperatura da cobertura superior em 105°C, para evitar a perda de volume da reação por evaporação. Ao fim da corrida, o *Cycle Threshold* (CT) dos poços foi exportado e armazenado em tabela para análise posterior. Os níveis de expressão do *PTPRZI* foram estimados através do cálculo do $2^{-\Delta\Delta CT}$, que é realizado da seguinte forma: Primeiro, o valor do CT do controle normalizador é subtraído do valor do CT do gene de interesse (ΔCT) para todas as amostras. Em seguida, a média do ΔCT das réplicas do mock é subtraída do ΔCT de cada uma das réplicas do experimento. O valor final resultante ($\Delta\Delta CT$) é multiplicado por -1 e se torna o expoente de uma base 2 ($2^{-\Delta\Delta CT}$). A significância do efeito da mediana da carga viral (variável independente – x) corrigido pelo efeito do tempo na mediana destes níveis (variável dependente – y) foi calculada empregando o modelo Linear Generalizado (GLM) com a distribuição Gaussiana Inversa, ideal para modelar a correlação de variáveis independentes, contínuas e positivas. As curvas de crescimento do ZIKV foram estimadas para cada MOI, através de modelos que melhor acomodaram os dados em cada caso. Todos os cálculos foram realizados utilizando as funções base do *software* R v.4.3.3, com auxílio do pacote ‘*readxl*’ para o gerenciamento de arquivos e do pacote ‘*ggplot2*’ para as representações gráficas (R CORE TEAM, 2021; WICKHAM, 2016; WICKHAM & BRYAN, 2023).

Experimentos de competição por afinidade

Para avaliar o papel do receptor de membrana *PTPRZI* nos processos iniciais de entrada e internalização do ZIKV em células de GBM, foram executados dois experimentos simultâneos de competição por afinidade entre as partículas virais e os anticorpos contra o domínio extracelular deste receptor (Sigma-Aldrich #HPA015103). Os anticorpos inespecíficos contra a proteína IgG foram utilizados como controles negativos em ambos os casos (Fig. 8). O objetivo destes experimentos foi mensurar o efeito da presença destes anticorpos na penetrabilidade viral por meio da quantificação da carga viral após 5h e a expressão das proteínas virais após 72h da infecção por ZIKV nesta linhagem celular. Para que

ambas as placas pudessem receber a mesma concentração de anticorpos, a concentração inicial (primeira diluição) dos mesmos foi calculada em 4,57µg/mL (concentração do anticorpo estoque: 300µg/mL; volume do anticorpo estoque: 8µL; volume total das primeiras diluições de ambas as placas: 525µL. Logo, seguindo a fórmula: $C1 \times V1 = C2 \times V2$, temos: $300 \times 8 = C2 \times 525$; $C2 = 300 \times 8 / 525 = 4,57$). Em ambos os casos, o plaqueamento foi realizado observando o número de células ideal para cada placa, de maneira idêntica aos protocolos descritos anteriormente. Foram utilizadas uma placa de 24 poços para o experimento de penetrabilidade viral (Fig. 8A) e uma placa de 96 poços para o experimento de expressão das proteínas virais (Fig. 8B). Ambas as placas foram infectadas 24h após o plaqueamento, de acordo com os protocolos que serão descritos nos tópicos a seguir.

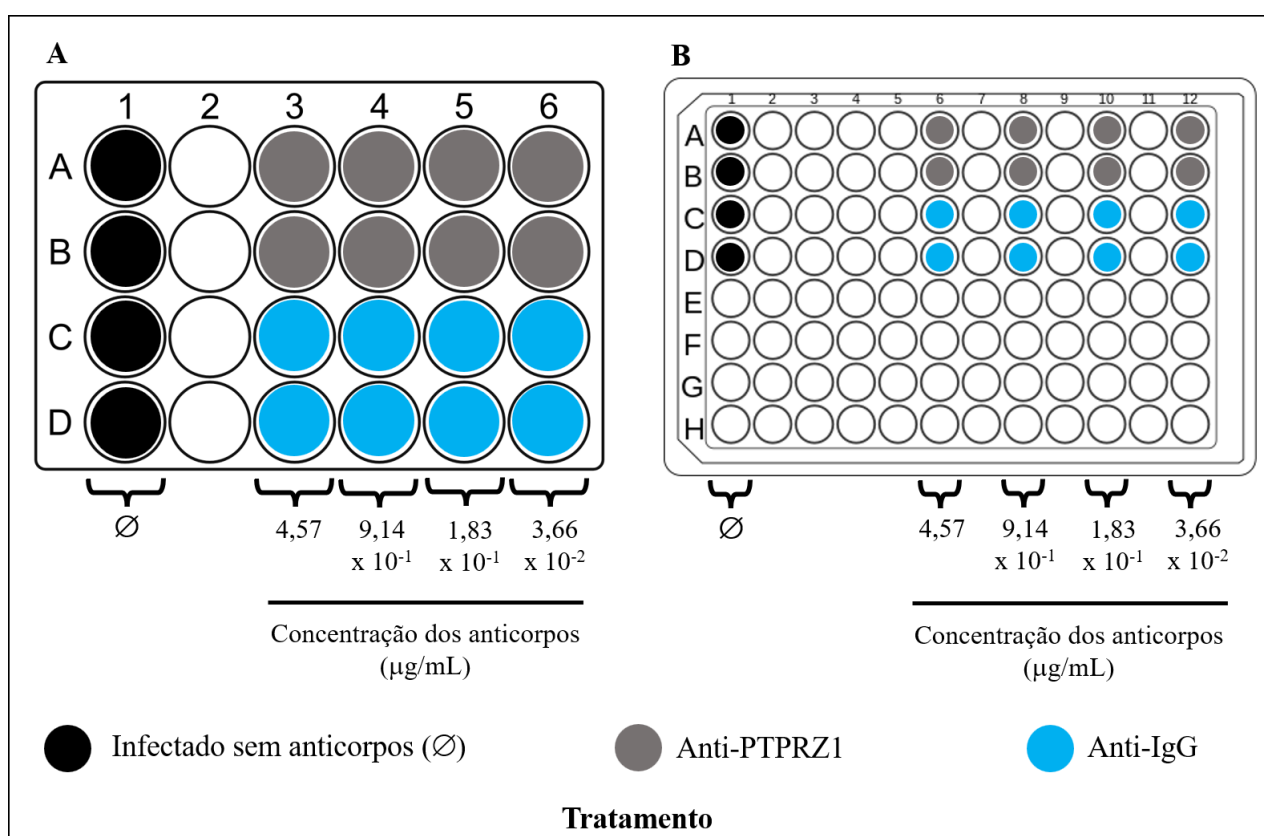


Figura 8. Desenho dos experimentos de competição por afinidade. Desenho dos experimentos que avaliaram a penetrabilidade viral (A) e expressão das proteínas virais (B) mediante infecção por ZIKV sem tratamento (cor preta) ou conjugada ao tratamento com anticorpos contra o domínio extracelular do receptor *PTPRZ1* (cor grafite) ou contra a proteína IgG (cor azul clara), que foi utilizada como tratamento controle.

Avaliação da penetrabilidade viral na presença de anticorpos

Seguindo o indicado por Srivastava e colaboradores, para ambos os tratamentos o meio de infecção foi preparado no gelo a partir de meio mínimo, pipetando um volume de ZIKV suficiente para atingir a MOI definida anteriormente, além de um volume de anticorpos chegando à concentração de 4,57µg/mL em um volume final de 250µL (SRIVASTAVA et al., 2020). Em seguida, esta solução de ZIKV e anticorpos para cada tratamento diluída em meio 0% foi submetida a quatro diluições seriadas de 5 vezes cada, a partir da pipetagem de 50µL dos volumes mais concentrados em tubos menos concentrados com volume de 200µL da solução de ZIKV em meio 0% na MOI definida. Todos os tubos foram identificados previamente conforme as suas diluições finais. Em seguida, a placa de 24 poços designada para este experimento foi colocada no gelo para o manuseio nos próximos passos: De dois em dois poços, o sobrenadante foi retirado da placa e substituído por 100µL das soluções de ZIKV e diferentes anticorpos recém-preparadas, para evitar o ressecamento das células. A placa foi incubada no gelo por 1h para a adsorção do vírus nas células. Durante este processo a placa foi levemente agitada a cada 15 minutos, para garantir uma adsorção uniforme. Terminada a adsorção, de dois em dois poços, o volume líquido da placa de titulação foi descartado e lavado com 500µL de PBS 1X gelado, para evitar o ressecamento das células. Este processo de lavagem foi repetido por três vezes. Terminada a lavagem, de dois em dois poços, o volume líquido da placa de titulação foi descartado e substituído por 500µL de meio de manutenção, para evitar o ressecamento das células. Em seguida a placa foi incubada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 5h. Ao término das 5h, as células foram desprendidas do fundo da placa segundo o seguinte procedimento: de dois em dois poços, o sobrenadante foi descartado e substituído por 100µL de tripsina a 0,125%. Em seguida, a placa foi incubada na estufa por 2 minutos. Após o desprendimento das células, 200µL de meio de cultivo foram adicionados e homogeneizados por pipetagem em cada poço. Em seguida o conteúdo dos poços foi coletado e passado para tubos devidamente identificados que foram então centrifugados a 300G por 5 minutos. Por fim, o sobrenadante foi descartado e os tubos contendo pellets de células foram armazenados em ultrafreezer a -80°C.

Para avaliar a carga viral intracelular, o RNA das amostras de penetrabilidade viral foi extraído de acordo com kit e protocolo idênticos aos descritos anteriormente. A quantificação e normalização via fluorimetria se deram de acordo com kit e protocolo idênticos aos descritos anteriormente. Finalmente, a carga viral do ZIKV foi quantificada por meio de um ensaio de RT-qPCR de acordo com kit e protocolo idênticos aos descritos para o ensaio de cinética viral. Além disto, os níveis de *GAPDH* das amostras foram quantificados por meio de ensaio de RT-qPCR em uma segunda placa, de acordo com kit e protocolo idênticos aos descritos para o

ensaio de expressão, para confirmar o resultado da normalização via fluorimetria e excluir amostras potencialmente degradadas. Ao fim da corrida, os valores de carga viral estimados pela curva padrão foram extraídos e armazenados em tabela para processamento e análise de dados posterior. A mediana dos valores de cada tratamento em uma determinada diluição dos anticorpos foi calculada utilizando as funções base do *software* R v.4.3.3, com o auxílio dos pacotes ‘readxl’ para gerenciamento de arquivos e do pacote ‘ggplot2’ para representações gráficas (R CORE TEAM, 2021; WICKHAM, 2016; WICKHAM & BRYAN, 2023). A significância estatística dos resultados foi testada através de Análise de Covariância (ANCOVA), ideal para o desenho deste experimento, que envolve a medição do efeito das variáveis categóricas (diferentes tratamentos), controlando para os efeitos de uma variável contínua (diluição seriada dos anticorpos). Para conduzir esta análise, foram utilizados os pacotes *car* (FOX & WEISBERG, 2019) e *lsmeans* (LENTH, 2016) no *software* R v.4.3.3 (R CORE TEAM, 2021).

Avaliação da infectividade viral pós-72h na presença de anticorpos anti-PTPRZ1

O preparo dos reagentes e o procedimento de infecção executados na placa utilizada no ensaio de infectividade percentual pós-72h se deu de maneira bastante similar ao que foi descrito para o ensaio de penetrabilidade viral, com as diferenças principais residindo nos volumes pipetados nos poços, uma vez que a estrutura das placas é diferente. O volume da solução contendo a concentração inicial dos anticorpos foi de 75µL. As quatro diluições seriadas de 5 vezes cada foram preparadas a partir da pipetagem de 15µL dos volumes mais concentrados em tubos menos concentrados com volume de 60µL da solução de ZIKV em meio 0% na MOI definida. O volume utilizado para infecção foi de 30µL por poço. O volume de PBS gelado utilizado para lavagem foi de 80µL. Uma diferença importante entre os dois protocolos é a de que o meio de manutenção (80µL) adicionado aos poços no experimento de avaliação de infectividade percentual continha anticorpos nas concentrações designadas para cada poço. Esta adição se fez importante, tendo em vista que os vírus seriam cultivados por 72h, e na hipótese da infecção por ZIKV induzir a expressão do receptor *PTPRZ1*, o cultivo em um meio sem anticorpos comprometeria a visualização do efeito do bloqueio dos receptores na aferição da infectividade percentual. Enfim, a placa foi incubada na estufa a 37°C com 5% de CO₂ por 72h.

O experimento de imunofluorescência para avaliação da infectividade percentual foi executado de maneira quase idêntica ao protocolo anteriormente descrito, com a diferença

principal residindo no fracionamento dos campos durante o processo de coleta de dados: Uma vez que, no presente caso, foram plaqueadas 4 réplicas para o controle sem tratamento com anticorpos, os 10 campos foram fracionados da seguinte maneira: 3 campos selecionados no poço da réplica 1, 3 campos selecionados no poço da réplica 2, 2 campos selecionados no poço da réplica 3 e 2 campos selecionados no poço da réplica 4. Para os demais poços contendo diferentes tratamentos e diluições, as duplicatas foram fracionadas da seguinte maneira: 5 campos selecionados no poço da duplicata 1 e 5 campos selecionados no poço da duplicata 2. A mediana, primeiro e terceiro quartis dos valores de infectividade percentual para cada caso em 72h pós-infecção foram calculados utilizando as funções base do *software* R v.4.3.3, com o auxílio dos pacotes ‘readxl’ para gerenciamento de arquivos e dos pacotes ‘ggplot2’, ‘scales’ e ‘ggpubr’ para representações gráficas (KASSAMBARA, 2023; R CORE TEAM, 2021; WICKHAM, 2016; WICKHAM et al, 2023). A significância estatística dos resultados foi testada através de teste t de Student utilizando as funções base do *software* R v.4.3.3 (R CORE TEAM, 2021).

Referências

- AGUIAR, R. S. et al. Molecular alterations in the extracellular matrix in the brains of newborns with congenital Zika syndrome. **Sci. Signal**, v. 13, p. eaay6736, jun. 2020.
- DONALD, C. L. et al. Full Genome Sequence and sfRNA Interferon Antagonist Activity of Zika Virus from Recife, Brazil. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 10, out. 2016.
- FOX, J.; WEISBERG, S. An R Companion to Applied Regression. **Sage**, n. 3, 2019.
- KASSAMBARA, A. **Ggpubr: “ggplot2” Based Publication Ready Plots**, 2023. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=ggpubr>. Acesso em: 16/04/2024.
- LENTH, R. V. Least-Squares Means: The R Package lsmeans. **Journal of Statistical Software**, v. 69, n. 1, p. 1–33, 2016.
- MEANS, R. E. et al. The propagation and quantification of two emerging oncolytic viruses: Vesicular stomatitis (VSV) and Zika (ZIKV). **Methods in Molecular Biology**. v. 2097, p. 253–263, 2019.
- R CORE TEAM. **R: A Language and Environment for Statistical Computing**. Vienna, Austria, 2021. Disponível em: <https://www.R-project.org/> Acesso em: 16/04/2024.
- SRIVASTAVA, M. et al. Chemical proteomics tracks virus entry and uncovers NCAM1 as Zika virus receptor. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1-10, dez. 2020.

URBANEK, S. **png: Read and write PNG images**, 2022. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=png>. Acesso em: 16/04/2024.

WICKHAM, H. **ggplot2: Elegant Graphics for Data Analysis**. Springer-Verlag, New York, 2016.

WICKHAM, H.; BRYAN, J. **readxl: Read Excel Files**, 2023. Disponível em: <https://CRAN.R-project.org/package=readxl>. Acesso em: 16/04/2024.

WICKHAM, H. et al. **scales: Scale Functions for Visualization**, 2023. Disponível em: [https://CRAN.R-project.org/package=scales](#). Acesso em: 16/04/2024.

Reliability assessment of in vitro studies		
		126
Red criteria: the maximum score is needed for these criteria to achieve reliability category 1 or 2 Please evaluate with special care!		
Criteria		Evaluator's explanations, comments on criteria, etc.
No.	Criteria Group I: Test substance identification	Score
1	Was the virus strain identified?	Question adapted for the context of the review.
2	Is the viral model given?	Question adapted for the context of the review.
3	Is information on the source/origin of the virus given?	Question adapted for the context of the review.
4	Is all information on the nature and/or properties of the test item given, which you deem <u>indispensable</u> for judging the data (see explanation for examples)?	
Criteria Group II: Test system characterisation		
5	Is the test system described?	
6	Is information given on the source/origin of the test system?	
7	Are necessary information on test system properties, and on conditions of cultivation and maintenance given?	
Criteria Group III: Study design description		
8	Is the method of administration given (see explanations for details)?	
9	Is the virus' MOI given?	Question adapted for the context of the review.
10	Are frequency and duration of exposure as well as time-points of observations explained?	
11	Were negative controls included (give also point, if not necessary, see explanations)?	
12	Were positive controls included (give also point, if not necessary, see explanations)?	
13	Is the number of replicates (or complete repetitions of experiment) given?	
Criteria Group IV: Study results documentation		
14	Are the study endpoint(s) and their method(s) of determination clearly described?	
15	Is the description of the study results for all endpoints investigated transparent and complete?	
16	Are the statistical methods for data analysis given and applied in a transparent manner (give also point, if not necessary/applicable, see explanations)?	
Criteria Group V: Plausibility of study design and data		
17	Is the study design chosen appropriate for obtaining the substance-specific data aimed at (see explanations for details)?	
18	Are the <u>quantitative</u> study results reliable (see explanations for arguments)?	
		0

			WARNING: check for unprocessed criteria! (for each criterium a score has to be selected)
		0	
	A Numerical result leads to initial Category:	3	
	B Checking red scores leads to revised Category:	3	
	C Evaluator's proposal: Category:		The final score was determined by rounding the average of the initial category (A) and the revised category (B) to the nearest integer.
	D Justification in case evaluator deviates from B:		
	Since this adapted version of the instrument, tailored for oncolytic virus studies, has not yet been formally validated, we chose not to rely solely on the revised category for a deterministic score.		

SARS-CoV-2 Genomic Surveillance in Brazil: A Systematic Review with Scientometric Analysis

Diego Menezes , Paula Luize Camargos Fonseca , João Locke Ferreira de Araújo  and Renan Pedra de Souza *

Grupo de Pesquisa em Bioestatística e Epidemiologia Molecular, Laboratório de Biologia Integrativa, Programa de Pós-Graduação em Genética, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil

* Correspondence: renanrps@ufmg.br; Tel.: +55-31340-92570

Abstract: Several studies have monitored the SARS-CoV-2 variants in Brazil throughout the pandemic. Here, we systematically reviewed and conducted a scientometric analysis of the SARS-CoV-2 genomic surveillance studies using Brazilian samples. A Pubmed database search on October 2022 returned 492 articles, of which 106 were included. Ninety-six different strains were reported, with variant of concern (VOC) gamma ($n = 35,398$), VOC delta ($n = 15,780$), and the variant of interest zeta ($n = 1983$) being the most common. The top three states with the most samples in the published articles were São Paulo, Rio de Janeiro, and Minas Gerais. Whereas the first year of the pandemic presented primary circulation of B.1.1.28 and B.1.1.33 variants, consecutive replacements were observed between them and VOI zeta, VOC gamma, VOC delta, and VOC omicron. VOI mu, VOI lambda, VOC alpha, and VOC beta were also detected but failed to reach significant circulation. Co-infection, re-infection, and vaccine breakthrough reports were found. Article co-citation differed from the co-authorship structure. Despite the limitations, we expect to give an overview of Brazil's genomic surveillance studies and contribute to future research execution.



Citation: Menezes, D.; Fonseca, P.L.C.; de Araújo, J.L.F.; Souza, R.P.d. SARS-CoV-2 Genomic Surveillance in Brazil: A Systematic Review with Scientometric Analysis. *Viruses* **2022**, *14*, 2715. <https://doi.org/10.3390/v14122715>

Academic Editors: Marta Giovanetti and Luiz Carlos Junior Alcantara

Received: 20 September 2022

Accepted: 2 December 2022

Published: 5 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Keywords: COVID-19; molecular epidemiology; next-generation sequencing

1. Introduction

The coronavirus disease (COVID-19) is caused by severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) infection, and was first reported in December 2019. The SARS-CoV-2 virus had been registered in 197 countries by March 2020, when the World Health Organization declared the novel coronavirus outbreak a global pandemic. More than 450 million cases and 6.0 million deaths have been reported worldwide [1]. Although the pandemic remains of concern, SARS-CoV-2 fatalities reduction has been observed mainly due to vaccination programs. Brazil has been heavily affected by COVID-19 [2,3]. Almost 35 million cases and 700,000 deaths have been documented since the first Brazilian case [4].

Viral genetics and evolution have been the main researched topics since the first viral genome was published [5]. Sequencing studies have promptly found viral diversity. Viral nomenclature was standardised in 2020 [6]. In 2021, Greek alphabet letters were introduced [7] to enable clear communication regarding lineages that presented alarming structural mutations: variants of interest (VOIs) and concern (VOCs) [8]. An unprecedented genomic surveillance effort was carried out [9], strengthened by the development, repositioning, and availability of sequencing services (e.g., databases, analysis tools, and other bioinformatics resources) [10–12]. A similar trend was observed among research groups previously conducting viral genomic surveillance studies in Brazil [13–15]. Here, we systematically reviewed and conducted scientometric analyses using the SARS-CoV-2 genomic surveillance studies characterising Brazilian samples.

REVIEW

Systematic review of host genetic association with Covid-19 prognosis and susceptibility: What have we learned in 2020?

João Locke Ferreira de Araújo^{1,2,3}  | Diego Menezes^{1,2,3}  |
 Julia Maria Saraiva-Duarte^{1,3}  | Luciana de Lima Ferreira^{1,2,3}  |
 Renato Santana de Aguiar^{1,2,3}  | Renan Pedra de Souza^{1,2,3} 

¹Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

²Grupo de Pesquisa em Bioestatística e Epidemiologia molecular, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

³Programa de Pós-graduação em Genética, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

Correspondence

Renan Pedra de Souza, Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antonio Carlos, 6627 ICB, Pampulha 31270901, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.

Email: renanrps@ufmg.br

Funding information

Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais

Summary

Biomarker identification may provide strategic opportunities to understand disease pathophysiology, predict outcomes, improve human health, and reduce healthcare costs. The highly heterogeneous Covid-19 clinical manifestation suggests a complex interaction of several different human, viral and environmental factors. Here, we systematically reviewed genetic association studies evaluating Covid-19 severity or susceptibility to SARS-CoV-2 infection following PRISMA recommendations. Our research comprised papers published until December 31st, 2020, in PubMed and BioRxiv databases focusing on genetic association studies with Covid-19 prognosis or susceptibility. We found 20 eligible genetic association studies, of which 11 assessed Covid-19 outcome and 14 evaluated infection susceptibility (five analyzed both effects). Q-genie assessment indicated moderate quality. Five large-scale association studies (GWAS, whole-genome, or exome sequencing) were reported with no consistent replication to date. Promising hits were found on the 3p21.31 region and ABO locus. Candidate gene studies examined *ACE1*, *ACE2*, *TMPRSS2*, *IFITM3*, *APOE*, *Furin*, *IFNL3*, *IFNL4*, *HLA*, *TNF-α* genes, and ABO system. The most evaluated single locus was the ABO, and the most sampled region was the HLA with three and five candidate gene studies, respectively. Meta-analysis could not be performed. Available data showed the need for further reports to replicate claimed associations.

KEYWORDS

candidate genetic variants, Covid-19, genetic association, polymorphisms, SARS-CoV-2, susceptibility

Abbreviations: ABO, ABO blood group system; ACE1, angiotensin-converting enzyme-1; ACE2, angiotensin-converting enzyme-2; APOE, apolipoprotein E; CLUAP1, Clusterin Associated Protein 1; Covid-19, Coronavirus disease; DES, Desmin; DNAH7, Dynein Axonemal Heavy Chain 7; GOLGA8B, Golgin A8 Family Member B; GWAS, Genome-wide association study; HLA, Human leukocyte antigen; IFITM3, Interferon Induced Transmembrane Protein 3; IFNL3, Interferon Lambda 3; IFNL4, Interferon Lambda 4; IRF7, Interferon Regulatory Factor 7; MUC2, Mucin 2; PCDH15, Protocadherin Related 15; PCR, Polymerase chain reaction; RIMBP3, RIMS binding protein 3; RT, reverse transcriptase; SARS-CoV-2, severe acute respiratory syndrome coronavirus 2; SPEG, Striated Muscle Enriched Protein Kinase; SSP, sequence-specific oligonucleotide; STREGA, Strengthening the reporting of genetic association studies; STXBP5, Syntaxin Binding Protein 5; TLR3, Toll-Like Receptor 3; TMEM189, Transmembrane protein 189; TMPRSS2, Transmembrane protease, serine 2; TNF-α, Tumor necrosis factor-alpha; TOMM7, Translocase of Outer Mitochondrial Membrane 7; UBE2V1, Ubiquitin Conjugating Enzyme E2 V1; WSB1, WD Repeat and SOCS Box Containing 1.



IFITM3, FURIN, ACE1, and TNF- α Genetic Association With COVID-19 Outcomes: Systematic Review and Meta-Analysis

João Locke Ferreira de Araújo, Diego Menezes, Renato Santana de Aguiar and Renan Pedra de Souza*

Grupo de Pesquisa em Bioestatística e Epidemiologia Molecular, Laboratório de Biologia Integrativa, Programa de Pós Graduação em Genética, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

OPEN ACCESS

Edited by:

José M. Álvarez-Castro,
University of Santiago de Compostela,
Spain

Reviewed by:

Martha Guevara-Cruz,
Instituto Nacional de Ciencias Médicas
y Nutrición Salvador Zubirán
(INCMNSZ), Mexico
Gagandeep Kaur,
University of Rochester, United States

*Correspondence:

Renan Pedra de Souza
renanrps@ufmg.br

Specialty section:

This article was submitted to
Applied Genetic Epidemiology,
a section of the journal
Frontiers in Genetics

Received: 13 September 2021

Accepted: 11 February 2022

Published: 01 April 2022

Citation:

de Araújo JLF, Menezes D, Aguiar RSD
and Souza RPD (2022) IFITM3, FURIN,
ACE1, and TNF- α Genetic Association
With COVID-19 Outcomes: Systematic
Review and Meta-Analysis.
Front. Genet. 13:775246.
doi: 10.3389/fgene.2022.775246

Human polymorphisms may contribute to SARS-CoV-2 infection susceptibility and COVID-19 outcomes (asymptomatic presentation, severe COVID-19, death). We aimed to evaluate the association of *IFITM3*, *FURIN*, *ACE1*, and *TNF- α* genetic variants with both phenotypes using meta-analysis. The bibliographic search was conducted on the PubMed and Scielo databases covering reports published until February 8, 2022. Two independent researchers examined the study quality using the Q-Genie tool. Using the Mantel-Haenszel weighted means method, odds ratios were combined under both fixed- and random-effect models. Twenty-seven studies were included in the systematic review (five with *IFITM3*, two with *Furin*, three with *TNF- α* , and 17 with *ACE1*) and 22 in the meta-analysis (*IFITM3* $n = 3$, *TNF- α* , and *ACE1* $n = 16$). Meta-analysis indicated no association of 1) *ACE1* rs4646994 and susceptibility, 2) *ACE1* rs4646994 and asymptomatic COVID-19, 3) *IFITM3* rs12252 and ICU hospitalization, and 4) *TNF- α* rs1800629 and death. On the other hand, significant results were found for *ACE1* rs4646994 association with COVID-19 severity (11 studies, 692 severe cases, and 1,433 nonsevere controls). The *ACE1* rs4646994 deletion allele showed increased odds for severe manifestation (OR: 1.45; 95% CI: 1.26–1.66). The homozygous deletion was a risk factor (OR: 1.49, 95% CI: 1.22–1.83), while homozygous insertion presented a protective effect (OR: 0.57, 95% CI: 0.45–0.74). Further reports are needed to verify this effect on populations with different ethnic backgrounds.

Systematic Review Registration: https://www.crd.york.ac.uk/prosperodisplay_record.php?ID=CRD42021268578, identifier CRD42021268578

Keywords: polymorphism, genetic association study, candidate genes, transposable elements, biomarkers, host genetics

INTRODUCTION

Coronavirus disease 2019 (COVID-19) clinical presentation is heterogeneous, ranging from entirely asymptomatic up to severe cases and death. Another level of heterogeneity is observed regarding persistent symptoms: one study has estimated that the median proportion of individuals who experienced at least one persistent symptom was 73% (Nasserie et al., 2021). Uncovering biomarkers



Biosafety in Dental Health Care During the COVID-19 Pandemic: A Longitudinal Study

OPEN ACCESS

Edited by:

Joana Cunha-Cruz,
University of Alabama at Birmingham,
United States

Reviewed by:

Victor Javier Beltrán Varas,
University of La Frontera, Chile
Susana Margarita Lorenzo-Erro,
Universidad de la República, Uruguay

*Correspondence:

Mauro Henrique Nogueira Guimarães
de Abreu
maurohenriqueabreu@gmail.com
Renato Santana de Aguiar
santanamt@gmail.com
Renan Pedra de Souza
renanpedra@gmail.com
Ricardo Santiago Gomez
rsgomez.ufmg@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Oral Health Promotion,
a section of the journal
Frontiers in Oral Health

Received: 07 February 2022

Accepted: 08 March 2022

Published: 10 May 2022

Citation:

Miguita L, Martins-Chaves RR, Geddes VEV, Mendes SR, Costa SFS, Fonseca PLC, Menezes D, Souza RM, Queiroz DC, Alves HJ, Freitas RAB, Cruz AF, Moreira RG, Moreira FRR, Bemquerer LM, Aguiar DR, Souza e Silva ME, Sampaio AA, Jardimino FDM, Souza LN, Silva TA, Gomes CC, de Abreu MHNG, Aguiar RS, de Souza RP and Gomez RS (2022) Biosafety in Dental Health Care During the COVID-19 Pandemic: A Longitudinal Study. *Front. Oral. Health* 3:871107. doi: 10.3389/froh.2022.871107

Lucyene Miguita¹, Roberta Rayra Martins-Chaves², Victor Emmanuel Viana Geddes³, Suellen da Rocha Mendes⁴, Sara Ferreira dos Santos Costa², Paula Luize Camargos Fonseca³, Diego Menezes³, Rafael Marques de Souza³, Daniel Costa Queiroz³, Hugo José Alves³, Raphaela Alvarenga Braga de Freitas², Aline Fernanda Cruz², Rennan Garcias Moreira⁵, Filipe Romero Rebello Moreira⁶, Larissa Marques Bemquerer², Diego Rodrigues de Aguiar⁴, Maria Elisa de Souza e Silva⁷, Aline Araújo Sampaio², Francisca Daniele Moreira Jardimino², Leandro Napier de Souza², Tarcília Aparecida da Silva², Carolina Cavaliéri Gomes¹, Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu^{4*}, Renato Santana de Aguiar^{3*}, Renan Pedra de Souza^{3*} and Ricardo Santiago Gomez^{2*}

¹ Department of Pathology, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ² Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ³ Department of Genetics, Ecology and Evolution, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ⁴ Department of Community and Preventive Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ⁵ Multiusers Laboratories Center, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil, ⁶ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Belo Horizonte, Brazil, ⁷ Department of Operative Dentistry, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Brazil

Background: The coronavirus disease 2019 (COVID-19) pandemic had quite an impact on dental health care. Concerns about the risk of SARS-CoV-2 transmission through contaminant fluids and droplet formation during several dental procedures highly impacted dental health care, drastically reducing the number of dental practices worldwide. To monitor SARS-CoV-2 contamination in dental clinics, a longitudinal study was carried out during the return of dental practice at university.

Methods: Dental health care professionals [(DHCPs); teachers, undergraduate dental students, and dental assistants] and patients were screened for SARS-CoV-2 RNA in a dental school clinic environment from 11th January to 12th March 2021 (9 weeks). Serological testing was performed on DHCPs in two-time points. Additionally, samples with low Ct values were sequenced to identify the circulating SARS-CoV-2 variant and possible transmission clusters.

Results: We found a low number of dental staff (5.8%), patients (0.9%), and environment sites (0.8%) positive for SARS-CoV-2. Most positive cases had asymptomatic to mild symptoms, and two asymptomatic DHCPs presented prolonged infection. In the first week after previous exposure to COVID-19, 16.2% of DHCPs had IgM or IgG antibodies against SARS-CoV-2, and 1/3 of them had undetected antibodies in the last weeks. The variant zeta (P.2) could be detected. No cross-infection was observed between participants.



OPEN

Spatial and temporal fluctuations in COVID-19 fatality rates in Brazilian hospitals

Andrea Brizzi^{1,23}, Charles Whittaker^{1,2,23}, Luciana M. S. Servo^{3,23}, Iwona Hawryluk^{1,2,23}, Carlos A. Prete Jr^{4,23}, William M. de Souza^{5,23}, Renato S. Aguiar^{6,7}, Leonardo J. T. Araujo⁸, Leonardo S. Bastos⁹, Alexandra Blenkinsop¹, Lewis F. Buss^{2,10}, Darlan Candido¹¹, Marcia C. Castro¹², Silvia F. Costa¹⁰, Julio Croda¹³, Andreza Aruska de Souza Santos¹⁴, Christopher Dye¹¹, Seth Flaxman¹⁵, Paula L. C. Fonseca⁶, Victor E. V. Geddes⁶, Bernardo Gutierrez¹¹, Philippe Lemey¹⁶, Anna S. Levin¹⁰, Thomas Mellan², Diego M. Bonfim⁶, Xenia Miscouridou¹, Swapnil Mishra^{12,17}, Mélodie Monod¹, Filipe R. R. Moreira¹⁸, Bruce Nelson¹⁹, Rafael H. M. Pereira³, Otavio Ranzani²⁰, Ricardo P. Schnekenberg²¹, Elizaveta Semenova¹, Raphael Sonabend², Renan P. Souza⁶, Xiaoyue Xi¹, Ester C. Sabino¹⁰ ✉, Nuno R. Faria^{2,10,11,22} ✉, Samir Bhatt^{12,17} ✉ and Oliver Ratmann^{1,23} ✉

The severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) Gamma variant of concern has spread rapidly across Brazil since late 2020, causing substantial infection and death waves. Here we used individual-level patient records after hospitalization with suspected or confirmed coronavirus disease 2019 (COVID-19) between 20 January 2020 and 26 July 2021 to document temporary, sweeping shocks in hospital fatality rates that followed the spread of Gamma across 14 state capitals, during which typically more than half of hospitalized patients aged 70 years and older died. We show that such extensive shocks in COVID-19 in-hospital fatality rates also existed before the detection of Gamma. Using a Bayesian fatality rate model, we found that the geographic and temporal fluctuations in Brazil's COVID-19 in-hospital fatality rates were primarily associated with geographic inequities and shortages in healthcare capacity. We estimate that approximately half of the COVID-19 deaths in hospitals in the 14 cities could have been avoided without pre-pandemic geographic inequities and without pandemic healthcare pressure. Our results suggest that investments in healthcare resources, healthcare optimization and pandemic preparedness are critical to minimize population-wide mortality and morbidity caused by highly transmissible and deadly pathogens such as SARS-CoV-2, especially in low- and middle-income countries.

Since late 2020, emerging variants of concern of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 (SARS-CoV-2) have led to substantial epidemic waves and marked increases in coronavirus disease 2019 (COVID-19) deaths^{1–5}. In Brazil, the SARS-CoV-2 Gamma variant of concern (also known as P.1, 20J/501Y.V3 or GR/501Y.V3, VOC-21JAN-02 or VOC202101/02) was first detected in December 2020 in Manaus, Amazonas state,

in north Brazil^{3,6,7}. Gamma is characterized by several amino acid substitutions in the spike protein, including L18E, N501Y, E484K and K417N, that have been associated with increased transmissibility and immune escape^{3,8,9}. Three weeks after its detection, Gamma became the dominant lineage circulating in Manaus as measured by variant frequency³. The rapid spread of Gamma through the country was followed by waves of COVID-19-associated mortality,

¹Department of Mathematics, Imperial College London, London, UK. ²MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, Jameel Institute, School of Public Health, Imperial College London, London, UK. ³Institute for Applied Economic Research, IPEA, Brasília, Brazil. ⁴Departamento de Engenharia de Sistemas Eletrônicos, Escola Politécnica, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ⁵World Reference Center for Emerging Viruses and Arboviruses and Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston TX, USA. ⁶Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil. ⁷Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro, Brazil. ⁸Laboratory of Quantitative Pathology, Center of Pathology, Adolfo Lutz Institute, São Paulo, Brazil. ⁹Programa de Computação Científica, Fundação Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil. ¹⁰Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e Instituto de Medicina Tropical da Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo, São Paulo, Brazil. ¹¹Department of Zoology, University of Oxford, Oxford, UK. ¹²Department of Global Health and Population, Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston MA, USA. ¹³Department of Epidemiology of Microbial Diseases, Yale School of Public Health, New Haven CT, USA. ¹⁴Latin American Centre, University of Oxford, Oxford, UK. ¹⁵Department of Computer Science, University of Oxford, Oxford, UK. ¹⁶Department of Microbiology, Immunology and Transplantation, Rega Institute, KU Leuven – University of Leuven, Leuven, Belgium. ¹⁷Section of Epidemiology, School of Public Health, University of Copenhagen, Copenhagen, Denmark. ¹⁸Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Brazil. ¹⁹Environmental Dynamics, INPA, National Institute for Amazon Research, Manaus, Brazil. ²⁰Barcelona Institute for Global Health, ISGlobal, Barcelona, Spain. ²¹Nuffield Department of Clinical Neurosciences, University of Oxford, Oxford, UK. ²²Department of Infectious Disease Epidemiology, Imperial College London, London, UK. ²³These authors contributed equally: Andrea Brizzi, Charles Whittaker, Luciana M. S. Servo, Iwona Hawryluk, Carlos A. Prete Jr, William M. de Souza, Oliver Ratmann. ✉e-mail: sabinoec@usp.br; n.faria@imperial.ac.uk; s.bhatt@imperial.ac.uk; oratmann@gmail.com

Tracking the turnover of SARS-CoV-2 VOCs Gamma to Delta in a Brazilian state (Minas Gerais) with a high-vaccination status

Paula L. C. Fonseca,^{1,†} Filipe R. R. Moreira,^{2,3,†} Rafael M. de Souza,^{1,†} Natália R. Guimarães,⁴ Nara O. Carvalho,⁵ Talita E. R. Adelino,⁴ Hugo J. Alves,¹ Luíge B. Alvim,⁶ Darlan S. Candido,^{7,8} Helena P. Coelho,⁹ Alana V. B. Costa,⁴ Walyson C. Costa,¹ Alex F. de Carvalho,⁹ Bruna W. F. de Faria,¹⁰ Aline B. de Lima,⁶ Eneida S. de Oliveira,¹⁰ Carolina S. A. de Souza,¹¹ Fernanda G. de Souza,¹ Rillery C. Dias,¹ Victor E. V. Geddes,¹ Igor P. Godinho,⁹ Alessandro L. Gonçalves,¹ Karine L. Lourenço,⁹ Rubens D. M. Magalhães,⁹ Frederico S. V. Malta,⁶ Eva L. A. Medeiros,¹² Fernanda S. Mendes,⁵ Pedro H. B. de P. Mendes,⁴ Cristiane P. T. B. Mendonça,⁶ Andre L. Menezes,¹⁰ Diego Menezes,¹ Mariane T. Menezes,² Lucyene Miguita,¹³ Rennan G. Moreira,¹⁴ Renata B. Peixoto,¹⁵ Daniel C. Queiroz,¹ Adriana A. Ribeiro,⁴ Ana Paula de B. Ribeiro,⁴ Juliana W. Saliba,¹¹ Hugo I. Sato,^{9,8} Joice do P. Silva,^{1,6} Natiely P. Silva,⁵ Nuno R. Faria,^{2,7,8} Santuza M. R. Teixeira,⁹ Flávio G. da Fonseca,⁹ Ana Paula S. M. Fernandes,⁹ Danielle A. G. Zauli,⁶ José Nélío Januario,⁵ Jaqueline S. de Oliveira,¹² Felipe C. de M. Iani,^{4,†} Renato S. de Aguiar,^{1,16,†} and Renan P. de Souza^{1,†}

¹Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil, ²MRC Centre for Global Infectious Disease Analysis, J-IDEA, Imperial College London, Exhibition Rd, South Kensington, London SW7 2BX, UK, ³Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro, Av. Carlos Chagas Filho 373, Cidade Universitária, Rio de Janeiro 21941-902, Rio de Janeiro, Brazil, ⁴Fundacao Ezequiel Dias, Rua Conde Pereira Carneiro 80, Gameleira, Belo Horizonte 30510-010, Minas Gerais, Brazil, ⁵Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico-Nupad/Faculdade de Medicina/Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Av. Prof. Alfredo Balena 189, Centro, Belo Horizonte 30130-100, Minas Gerais, Brazil, ⁶Instituto Hermes Pardini, Av. das Nações 2448, Distrito Industrial, Vespasiano 33201003, Minas Gerais, Brazil, ⁷Department of Zoology, University of Oxford, 11a Mansfield Rd, Oxford OX13SZ, UK, ⁸Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar 470, Jardim América, São Paulo 05403000, São Paulo, Brazil, ⁹Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Rua Professor José Vieira de Mendonça 770, Engenho Nogueira, Belo Horizonte 31310260, Minas Gerais, Brazil, ¹⁰Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, Av. Afonso Pena 2336, Funcionários, Belo Horizonte 30130-040, Minas Gerais, Brazil, ¹¹Pan American Health Organization—PAHO, Av. Das Nações SEN, Asa Norte, Brasília 70312970, Brazil, ¹²Subsecretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Rodovia Papa João Paulo II 4143, Edifício Minas Gerais, Cidade Administrativa, Serra verde, Belo Horizonte 31630900, Minas Gerais, Brazil, ¹³Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil, ¹⁴Centro de Laboratórios Multiusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil, ¹⁵Departamento de Bioquímica e Imunologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627, Pampulha, Belo Horizonte 31270901, Minas Gerais, Brazil and ¹⁶Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro 22281100, Rio de Janeiro, Brazil

[†]These authors share the senior authorship.

[‡]These first authors contributed equally to this article.

[§]<https://orcid.org/0000-0001-5180-9983>

[¶]<https://orcid.org/0000-0002-3629-8529>

*Corresponding authors: E-mail: santanarnt@gmail.com; renanpedra@gmail.com

Abstract

The emergence and global dissemination of Severe Acute Respiratory Syndrome virus 2 (SARS-CoV-2) variants of concern (VOCs) have been described as the main factor driving the Coronavirus Disease 2019 pandemic. In Brazil, the Gamma variant dominated the epidemiological scenario during the first period of 2021. Many Brazilian regions detected the Delta variant after its first description and documented its spread. To monitor the introduction and spread of VOC Delta, we performed Polymerase Chain Reaction (PCR) genotyping and genome sequencing in ten regional sentinel units from June to October 2021 in the State of Minas Gerais (MG). We documented the introduction and spread of Delta, comprising 70 per cent of the cases 8 weeks later. Comparing the viral loads of the Gamma and Delta dominance periods, we provide additional evidence that the latter is more transmissible. The spread and dominance of Delta did not culminate in the increase in cases and deaths, suggesting that the vaccination may have restrained the epidemic growth. Analysis of 224 novel Delta genomes revealed that Rio de Janeiro state was the primary source for disseminating this variant in the state of MG. We present the establishment of Delta, providing evidence of its enhanced transmissibility and showing that this variant shift did not aggravate the epidemiological scenario in a high immunity setting.

Key words: Genomic surveillance; phylogeny; phylogeography; viral lineages; vaccines.

Article

Monitoring the Establishment of VOC Gamma in Minas Gerais, Brazil: A Retrospective Epidemiological and Genomic Surveillance Study

Hugo José Alves ^{1,†}, João Locke Ferreira de Araújo ^{1,†}, Paula Luize Camargos Fonseca ^{1,†}, Filipe Romero Rebello Moreira ^{2,†}, Diego Menezes Bonfim ¹, Daniel Costa Queiroz ¹, Lucyene Miguita ³, Rafael Marques de Souza ¹, Victor Emmanuel Viana Geddes ¹, Walyson Coelho Costa ¹, Jaqueline Silva de Oliveira ⁴, Eva Lídia Arcoverde Medeiros ⁴, Carolina Senra Alves de Souza ⁵, Juliana Wilke Saliba ⁵, André Luiz Menezes ⁶, Eneida Santos de Oliveira ⁶, Talita Emile Ribeiro Adelino ⁷, Natalia Rocha Guimaraes ⁷, Adriana Aparecida Ribeiro ⁷, Rennan Garcias Moreira ⁸, Danielle Alves Gomes Zauli ⁹, Joice do Prado Silva ⁹, Frederico Scott Varella Malta ⁹, Alessandro Clayton de Souza Ferreira ¹, Ana Valesca Fernandes Gilson Silva ¹⁰, Poliane Alfenas-Zerbini ¹¹, Flavia Oliveira de Souza ¹¹, Adriano de Paula Sabino ¹², Laura do Amaral Xavier ¹², Natália Virtude Carobin ¹², Alex Fiorini de Carvalho ¹³, Karine Lima Lourenço ¹³, Santuza Maria Ribeiro Teixeira ¹³, Ana Paula Salles Moura Fernandes ¹³, Flavio Guimarães da Fonseca ¹³, Jônatas Santos Abrahão ¹⁴, Felipe Campos de Melo Iani ⁷, Rodrigo Araújo Lima Rodrigues ¹⁴, Renan Pedra de Souza ^{1,*} and Renato Santana Aguiar ^{1,15,*}



Citation: Alves, H.J.; de Araújo, J.L.F.; Fonseca, P.L.C.; Moreira, F.R.R.; Bonfim, D.M.; Queiroz, D.C.; Miguita, L.; de Souza, R.M.; Geddes, V.E.V.; Costa, W.C.; et al. Monitoring the Establishment of VOC Gamma in Minas Gerais, Brazil: A Retrospective Epidemiological and Genomic Surveillance Study. *Viruses* **2022**, *14*, 2747. <https://doi.org/10.3390/v14122747>

Academic Editors: Marta Giovanetti and Luiz Carlos Junior Alcantara

Received: 27 October 2022

Accepted: 28 November 2022

Published: 9 December 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
- ² Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil
- ³ Departamento de Patologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
- ⁴ Subsecretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte 31585-200, Brazil
- ⁵ Pan American Health Organization-PAHO, Brasília 70312-970, Brazil
- ⁶ Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Belo Horizonte, Belo Horizonte 30130-040, Brazil
- ⁷ Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte 30510-010, Brazil
- ⁸ Centro de Laboratórios Multiusuários, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
- ⁹ Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte 30140-070, Brazil
- ¹⁰ Escola de Saúde Pública de Betim, Secretaria Municipal de Saúde, Prefeitura de Betim, Betim 32600-412, Brazil
- ¹¹ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Biotecnologia Aplicada à Agropecuária, Universidade Federal de Viçosa, Viçosa 36570-900, Brazil
- ¹² Laboratório de Institucional de Pesquisa em Biomarcadores, LINBIO, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas, Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
- ¹³ Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31310-260, Brazil
- ¹⁴ Laboratório de Vírus, Departamento de Microbiologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31279-901, Brazil
- ¹⁵ Instituto D'Or de Pesquisa e Ensino (IDOR), Rio de Janeiro 22281-100, Brazil
- * Correspondence: renanpedra@gmail.com (R.P.d.S.); santanarnt@gmail.com (R.S.A.)
- † These authors contributed equally to this work.

Abstract: Since its first identification in Brazil, the variant of concern (VOC) Gamma has been associated with increased infection and transmission rates, hospitalizations, and deaths. Minas Gerais (MG), the second-largest populated Brazilian state with more than 20 million inhabitants, observed a peak of cases and deaths in March–April 2021. We conducted a surveillance study in 1240 COVID-19-positive samples from 305 municipalities distributed across MG's 28 Regional Health Units (RHU) between 1 March to 27 April 2021. The most common variant was the VOC Gamma (71.2%), followed by the variant of interest (VOI) zeta (12.4%) and VOC alpha (9.6%). Although the predominance of Gamma was found in most of the RHUs, clusters of Zeta and Alpha variants were observed. One Alpha-clustered RHU has a history of high human mobility from countries with



SARS-CoV-2 Omicron BA.1, BA.2, and XAG identification during routine surveillance on a university campus in Belo Horizonte, Brazil, 2022

Daniel Costa Queiroz¹ · Natália Virtude Carobin² · Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos¹ · Paula Luize Camargos Fonseca¹ · Isabela Lorraine Braga-Paz¹ · Rillery Calixto Dias¹ · Jorge Gomes Goulart Ferreira¹ · Túlio Resende Freitas² · **Diego Menezes¹** · Sílvia Cristina Verde Mendes Nolasco² · Simone Rodrigues Ribeiro² · Thaís Salviana Ribeiro² · Laura do Amaral Xavier² · Karina Braga Gomes² · Adriano de Paula Sabino² · Renato Santana de Aguiar^{1,3} · Renan Pedra de Souza¹

Received: 29 July 2022 / Accepted: 12 October 2022 / Published online: 22 October 2022
© The Author(s) under exclusive licence to Sociedade Brasileira de Microbiologia 2022

Abstract

We report SARS-CoV-2 genomic surveillance results between Belo Horizonte, Brazil's third and fourth case waves. Samples were obtained through a routine university monitoring COVID-19 program from the 9th to the 22nd epidemiological weeks (March and June 2022). We identified ten samples from the BA.1 clade (BA.1, BA.1.1, and BA.1.14.1 lineages) and 45 samples from the BA.2 clade (BA.2, BA.2.56, BA.2.9, BA.2.62, BA.2.23, BA.2.81, and BA.2.10). We observed progressive replacement of the BA.1 by the BA.2 clade. Furthermore, two XAG recombinants were found in the 22nd week. Diversification of the omicron variant seems to have contributed to the resurgence of cases in Belo Horizonte, similarly to what has been reported in South Africa.

Keywords Genomic surveillance · Variants of concern · Phylogeny · Viral evolution · Recombinant variant

Introduction

COVID-19 has strongly impacted Brazil. The country presents the second-largest death toll worldwide and a significant reduction in life expectancy due to the pandemic [1]. Brazil, a country with a continental proportion, showed substantial heterogeneity in the number of cases and deaths across its territory. Minas Gerais, a state with more than 20,000,000 inhabitants, reported more than 60,000 deaths reaching almost 10% of the Brazilian total. Belo Horizonte, the capital of the Minas Gerais state, presented one of the lowest state capital mortality rates in Brazil [2].

SARS-CoV-2 variants played a significant role in the COVID-19 waves in Brazil [3]. Four waves could be identified in Minas Gerais: the first was in mid-2020 when B.1.1.28 and B.1.1.33 variants were circulating [4–6]; the second was after the introduction of alpha (B.1.1.7) and gamma (P.1) variants in late 2020 [7, 8]. The other two waves were observed in early 2022 after introducing the omicron variant and its subvariants. Interestingly, the delta variant in Brazil did not result in increased cases [9, 10].

All genomic surveillance studies published from Minas Gerais have used samples from the Brazilian Public Health

Responsible Editor: Luis Augusto Nero

Daniel Costa Queiroz and Natália Virtude Carobin contributed equally.

✉ Adriano de Paula Sabino
adriansabin01@gmail.com

✉ Renato Santana de Aguiar
santanarnt@gmail.com

✉ Renan Pedra de Souza
renanpedra@gmail.com

¹ Laboratório de Biologia Integrativa Departamento de Genética Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Brazil

² Laboratório Institucional de Pesquisa Em Biomarcadores Laboratório de Hematologia Clínica Departamento de Análises Clínicas E Toxicológicas Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Av. Antônio Carlos, 6627 ICB – Pampulha, Minas Gerais 31270901 Belo Horizonte, Brazil

³ Instituto D'OR de Pesquisa E Ensino, Rio de Janeiro, Brazil

Article

The Omicron Lineages BA.1 and BA.2 (*Betacoronavirus* SARS-CoV-2) Have Repeatedly Entered Brazil through a Single Dispersal Hub

Alessandra P. Lamarca ¹, Ueric José Borges de Souza ², Filipe Romero Rebello Moreira ³, Luiz G. P. de Almeida ¹, Mariane Talon de Menezes ³, Adrieli Barboza de Souza ⁴, Alessandro Clayton de Souza Ferreira ⁵, Alexandra L. Gerber ¹, Aline B. de Lima ⁵, Ana Paula de C. Guimarães ¹, Andréa Cony Cavalcanti ⁶, Aryel B. Paz e Silva ⁷, Bruna Israel Lima ⁸, Cirley Lobato ⁹, Cristiane Gomes Da Silva ⁶, Cristiane P. T. B. Mendonça ⁵, Daniel Costa Queiroz ⁷, Danielle Alves Gomes Zauli ⁵, Diego Menezes ⁷, Fábio Sossai Possebon ¹⁰, Franciano Dias Pereira Cardoso ¹¹, Frederico Scott Varella Malta ⁵, Isabela Braga-Paz ⁷, Joice do Prado Silva ⁵, Jorge Gomes Goulart Ferreira ⁷, Jucimária Dantas Galvão ¹¹, Leandro Magalhães de Souza ⁶, Leonardo Ferreira ⁴, Lia Gonçalves Possuelo ¹², Liliane Tavares de Faria Cavalcante ¹, Luíge B. Alvim ⁵, Luiz Fellype Alves de Souza ¹³, Luiza C. G. de Araújo E Santos ⁷, Rillery Calixto Dias ⁷, Rutilene Barbosa Souza ¹³, Thaís Regina y Castro ¹⁴, Andréia Rosane de Moura Valim ¹², Fabrício Souza Campos ¹⁵, João Pessoa Araujo, Jr. ¹⁰, Priscila de Arruda Trindade ¹⁴, Renato S. Aguiar ⁷, Robson Michael Delai ⁴ and Ana Tereza R. de Vasconcelos ^{1,*}



Citation: Lamarca, A.P.; Souza, U.J.B.d.; Moreira, F.R.R.; Almeida, L.G.P.d.; Menezes, M.T.d.; Souza, A.B.d.; Ferreira, A.C.d.S.; Gerber, A.L.; Lima, A.B.d.; Guimarães, A.P.d.C.; et al. The Omicron Lineages BA.1 and BA.2 (*Betacoronavirus* SARS-CoV-2) Have Repeatedly Entered Brazil through a Single Dispersal Hub. *Viruses* **2023**, *15*, 888. <https://doi.org/10.3390/v15040888>

Academic Editors: Andrew Davidson and Benjamin Liu

Received: 13 February 2023

Revised: 20 March 2023

Accepted: 27 March 2023

Published: 30 March 2023



Copyright: © 2023 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Bioinformática, Laboratório Nacional de Computação Científica, Petrópolis 25651-075, Brazil
 - ² Laboratório de Bioinformática e Biotecnologia, Universidade Federal do Tocantins, Campus de Gurupi, Palmas 77410-570, Brazil
 - ³ Laboratório de Virologia Molecular, Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-901, Brazil
 - ⁴ Centro de Medicina Tropical da Tríplice Fronteira, Foz do Iguaçu 85866-010, Brazil
 - ⁵ Departamento de Pesquisa & Desenvolvimento, Instituto Hermes Pardini, Belo Horizonte 30140-070, Brazil
 - ⁶ Laboratório Central de Saúde Pública Noel Nutels, Rio de Janeiro 20231-092, Brazil
 - ⁷ Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil
 - ⁸ Laboratório de Biologia Molecular, Parque Científico e Tecnológico Regional, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul 96815-900, Brazil
 - ⁹ Centro de Ciências de Saúde e do Desporto, Universidade Federal do Acre, Rio Branco 69920-900, Brazil
 - ¹⁰ Instituto de Biotecnologia, Universidade Estadual Paulista, Botucatu 18618-689, Brazil
 - ¹¹ Laboratório Central de Saúde Pública do Estado do Tocantins, Palmas 77054-970, Brazil
 - ¹² Departamento de Ciências da Vida, Universidade de Santa Cruz do Sul, Santa Cruz do Sul 96815-900, Brazil
 - ¹³ Centro de Infectologia Charles Mérieux and Laboratório Rodolphe Mérieux, Hospital das Clínicas do Acre, Rio Branco 69920-223, Brazil
 - ¹⁴ Laboratório de Biologia Molecular e Bioinformática Aplicadas a Microbiologia Clínica, Universidade Federal de Santa Maria, Santa Maria 97105-900, Brazil
 - ¹⁵ Laboratório de Virologia, Departamento de Microbiologia, Imunologia e Parasitologia, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 90010-150, Brazil
- * Correspondence: atr@lncc.br

Abstract: Brazil currently ranks second in absolute deaths by COVID-19, even though most of its population has completed the vaccination protocol. With the introduction of Omicron in late 2021, the number of COVID-19 cases soared once again in the country. We investigated in this work how lineages BA.1 and BA.2 entered and spread in the country by sequencing 2173 new SARS-CoV-2 genomes collected between October 2021 and April 2022 and analyzing them in addition to more than 18,000 publicly available sequences with phylodynamic methods. We registered that Omicron was present in Brazil as early as 16 November 2021 and by January 2022 was already more than 99% of samples. More importantly, we detected that Omicron has been mostly imported through the state of São Paulo, which in turn dispersed the lineages to other states and regions of Brazil. This knowledge can be used to implement more efficient non-pharmaceutical interventions against the introduction of new SARS-CoV variants focused on surveillance of airports and ground transportation.

Can SARS-CoV-2 screening in oral biopsies aid epidemiological surveillance?

Roberta Rayra Martins-Chaves^{1,2} | Marina Gonçalves Diniz³ | Lucyene Miguita³  |
Fernanda Aragão Felix¹ | Fernanda Faria Rocha¹ | Paula Luize Camargos Fonseca⁴ |
Victor Emmanuel Viana Geddes⁴ | **Diego Menezes⁴** | Rennan Garcias Moreira^{4,5} |
Tatiana Liborio-Kimura⁶ | Jeconias Câmara⁶ | Tássia Caroline da Costa Mendes⁶ |
Hélder Antônio Rebelo Pontes⁷  | Flavia Sirotheau Correa Pontes⁷ |
Thayanne Oliveira de Freitas Gonçalves⁸ | Thamyres Campos Fonsêca⁸ |
Aline Corrêa Abrahão⁸ | Mário José Romañach⁸ |
Ana Paula Negreiros Nunes Alves⁹ | Karuza Maria Alves Pereira¹⁰  |
Danyel Elias da Cruz Perez¹¹  | Elaine Judite de Amorim Carvalho¹¹ |
Jean Nunes dos Santos¹² | Flávia Caló de Aquino Xavier¹²  |
Fernando Costa Giffoni² | Alessandra Hubner de Souza² |
Carolina Cavaliéri Gomes³  | Sílvia Ferreira de Sousa¹ | Felipe Paiva Fonseca¹  |
Renan Pedra de Souza⁴  | Renato Santana Aguiar⁴ | Ricardo Santiago Gomez^{1,2}

¹Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

²Graduate Program in Medical Sciences, Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

³Department of Pathology, Biological Science Institute, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁴Department of Genetics, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁵Multiuser Laboratories Center, Biological Sciences Institute, Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil

⁶Department of Pathology and Legal Medicine, School of Medicine, Federal University of Amazonas, Manaus, Amazonas, Brazil

⁷Department of Oral Pathology, João de Barros Barreto University Hospital, Universidade Federal do Pará, Belém, Brazil

⁸Department of Oral Diagnosis and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal do Rio de Janeiro (UFRJ), Rio de Janeiro, Brazil

⁹Department of Dental Clinic, Faculty of Pharmacy, Dentistry, and Nursing, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil

¹⁰Department of Morphology, Faculty of Medicine, Universidade Federal do Ceará, Ceará, Brazil

¹¹Department of Clinical and Preventive Dentistry, Universidade Federal de Pernambuco, Recife, Brazil

¹²Laboratory of Oral and Maxillofacial Pathology, Dentistry School, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Brazil

Correspondence

Roberta Rayra Martins-Chaves, Medical School, Faculdade Ciências Médicas de Minas Gerais, Alameda Ezequiel Dias, 275 - Centro, Belo Horizonte, Minas Geras, Brazil.
Email: martins.chaves.rr@gmail.com

Ricardo Santiago Gomez, Department of Oral Surgery and Pathology, School of Dentistry, Universidade Federal de Minas Gerais.
Av. Antônio Carlos 6627, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil.
Email: professor@ricardogomez.com.br

Abstract

Background: Three years after the first confirmed COVID-19 case in Brazil, the outcomes of Federal government omissions in managing the crisis and anti-science stance heading into the pandemic have become even more evident. With over 36 million confirmed cases and nearly 700 000 deaths up to January 2023, the country is one of the hardest-hit places in the world. The lack of mass-testing programs was a critical broken pillar responsible for the quick and uncontrolled SARS-CoV-2 spread throughout the Brazilian population. Faced with this situation, we aimed to perform



Article

Retrospective Analysis of Omicron in Minas Gerais, Brazil: Emergence, Dissemination, and Diversification

Paula Luize Camargos Fonseca ^{1,†}, Isabela Braga-Paz ¹, Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos ¹, Rillery Calixto Dias ¹, Carolina Senra Alves de Souza ², Nara Oliveira Carvalho ³, Daniel Costa Queiroz ¹, Hugo José Alves ¹, João Locke Ferreira de Araújo ¹, Filipe Romero Rebello Moreira ⁴, Mariane Talon Menezes ⁴, Diego Menezes ¹, Aryel Beatriz Paz e Silva ¹, Jorge Gomes Goulart Ferreira ¹, Talita Emile Ribeiro Adelino ⁵, Andre Felipe Leal Bernardes ⁵, Natália Virtude Carobin ⁶, Renée Silva Carvalho ², Carolina Zaniboni Ferrari ², Natália Rocha Guimarães ⁵, Ludmila Oliveira Lamounier ⁵, Fernanda Gil Souza ¹, Luisa Aimeé Vargas ², Marisa de Oliveira Ribeiro ⁷, Monica Barcellos Arruda ⁷, Patricia Alvarez ⁷, Rennan Garcias Moreira ¹, Eneida Santos de Oliveira ⁸, Adriano de Paula Sabino ⁶, Jaqueline Silva de Oliveira ², José Nélio Januário ³, Felipe Campos de Melo Iani ⁵, Renan Pedra de Souza ^{1,*} and Renato Santana Aguiar ^{1,9,*}



Citation: Fonseca, P.L.C.; Braga-Paz, I.; de Araújo e Santos, L.C.G.; Dias, R.C.; de Souza, C.S.A.; Carvalho, N.O.; Queiroz, D.C.; Alves, H.J.; de Araújo, J.L.F.; Moreira, F.R.R.; et al. Retrospective Analysis of Omicron in Minas Gerais, Brazil: Emergence, Dissemination, and Diversification. *Microorganisms* **2024**, *12*, 1745. <https://doi.org/10.3390/microorganisms12091745>

Academic Editor: Eleonora Cella

Received: 16 July 2024

Revised: 6 August 2024

Accepted: 9 August 2024

Published: 23 August 2024



Copyright: © 2024 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

- ¹ Laboratório de Biologia Integrativa, Departamento de Genética, Ecologia e Evolução, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; camargos.paulaluize@gmail.com (P.L.C.F.); isabela-lorraine2010@hotmail.com (I.B.-P.); luizacamposgs@gmail.com (L.C.G.d.A.e.S.); rillery_calixto@hotmail.com (R.C.D.); dcqbioufmg@gmail.com (D.C.Q.); alves.hugo.j@gmail.com (H.J.A.); joalocke.bio@gmail.com (J.L.F.d.A.); t.menezes.diego@gmail.com (D.M.); arypaz06@gmail.com (A.B.P.e.S.); ferreira_jgg@yahoo.com (J.G.G.F.); nandags10@hotmail.com (F.G.S.); rennangm@gmail.com (R.G.M.)
- ² Subsecretaria de Vigilância em Saúde, Secretaria de Estado de Saúde de Minas Gerais, Belo Horizonte 31585-200, Brazil; carol.senraas@gmail.com (C.S.A.d.S.); reneecarv@gmail.com (R.S.C.); carolinazferrari@hotmail.com (C.Z.F.); luisaaimée@outlook.com (L.A.V.); jaquelinebmedica@hotmail.com (J.S.d.O.)
- ³ Núcleo de Ações e Pesquisa em Apoio Diagnóstico-Nupad, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 30130-100, Brazil; nara@nupad.medicina.ufmg.br (N.O.C.); nelio@nupad.medicina.ufmg.br (J.N.J.)
- ⁴ Departamento de Genética, Instituto de Biologia, Universidade Federal do Rio de Janeiro, Rio de Janeiro 21941-902, Brazil; filiperomero2@gmail.com (F.R.R.M.); marianetalon@gmail.com (M.T.M.)
- ⁵ Fundacao Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte 30510-010, Brazil; talitaemile@yahoo.com.br (T.E.R.A.); andrefelipeleal@yahoo.com.br (A.F.L.B.); natyroguiaman@yahoo.com.br (N.R.G.); ludmila.lamounier@funed.mg.gov.br (L.O.L.); felipeemrede@gmail.com (F.C.d.M.I.)
- ⁶ Laboratório Institucional de Pesquisa em Biomarcadores, Laboratório de Hematologia Clínica, Departamento de Análises Clínicas e Toxicológicas; Faculdade de Farmácia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte 31270-901, Brazil; natyvirca@gmail.com (N.V.C.); adriansabin01@gmail.com (A.d.P.S.)
- ⁷ Institute of Technology in Immunobiology Bio-Manguinhos, Oswaldo Cruz Foundation/Fiocruz, Rio de Janeiro 21040-900, Brazil; mribeiro@bio.fiocruz.br (M.d.O.R.); monica.arruda@bio.fiocruz.br (M.B.A.); palvarez@bio.fiocruz.br (P.A.)
- ⁸ Secretaria Municipal de Saúde de Belo Horizonte, Belo Horizonte 30130-012, Brazil; eneida.oliveira@pbh.gov.br
- ⁹ Instituto D'OR de Pesquisa e Ensino, Rio de Janeiro 22281-100, Brazil
- * Correspondence: renanpedra@gmail.com (R.P.d.S.); santanarnt@gmail.com (R.S.A.); Tel.: +55-31-3409-2895 (R.S.A.)
- [†] First author.

Abstract: Brazil is one of the countries most affected by COVID-19, with the highest number of deaths recorded. Brazilian Health Institutions have reported four main peaks of positive COVID-19 cases. The last two waves were characterized by the emergence of the VOC Omicron and its sublineages. This study aimed to conduct a retrospective surveillance study illustrating the emergence, dissemination, and diversification of the VOC Omicron in 15 regional health units (RHUs) in MG, the second most populous state in Brazil, by combining epidemiological and genomic data. A total of 5643 confirmed positive COVID-19 samples were genotyped using the panels TaqMan SARS-CoV-2 Mutation and 4Plex SC2/VOC Bio-Manguinhos to define mutations classifying the BA.1, BA.2, BA.4, and BA.5 sublineages. While sublineages BA.1 and BA.2 were more prevalent during the third wave, BA.4 and BA.5 dominated the fourth wave in the state. Epidemiological and viral

RESEARCH

Open Access



SARS-CoV-2 surveillance in captive animals at the belo horizonte zoo, Minas Gerais, Brazil

Anisleidy Pérez Castillo^{1,4}, João Victor Oliveira Miranda³, Paula Luize Camargos Fonseca³, Rennan Garcias Moreira⁵, Luiza Campos Guerra de Araújo e Santos³, Daniel Costa Queiroz³, Diego Menezes Bonfim³, Carlyle Mendes Coelho², Paula Cristina Senra Lima², Rafael Otávio Cançado Motta², Herlandes Penha Tinoco², Júlia Angélica Gonçalves da Silveira^{4*} and Renato Santana Aguiar^{3*}

Abstract

Background The pandemic caused by SARS-CoV-2 has not only affected humans but also raised concerns about its transmission to wild animals, potentially creating natural reservoirs. Understanding these dynamics is critical for preventing future pandemics and developing control strategies. This study aims to investigate the presence of SARS-CoV-2 in wild mammals at the Belo Horizonte Zoo in Brazil, analyzing the virus's evolution and zoonotic potential.

Methods The study was conducted at the Belo Horizonte Zoo, Minas Gerais, Brazil, covering a diverse population of mammals. Oropharyngeal, rectal, and nasal swabs were collected from 47 captive animals between November 2021 and March 2023. SARS-CoV-2 presence was determined using RT-PCR, and positive samples were sequenced for phylogenetic analysis. Consensus genomes were classified using Pangolin and NextClade tools, and a maximum likelihood phylogeny was inferred using IQ-Tree.

Results Of the 47 animals tested, nine (19.1%) were positive for SARS-CoV-2. Positive samples included rectal, oropharyngeal, and nasal swabs, with the highest positivity in rectal samples. Three genomes were successfully sequenced, revealing two variants: VOC Alpha in a maned wolf (*Chrysocyon brachyurus*) and a fallow deer (*Dama dama*), and VOC Omicron in a western lowland gorilla (*Gorilla gorilla gorilla*). Phylogenetic analysis indicated potential human-to-animal transmission, with animal genomes clustering close to human samples from the same region.

Conclusions This study highlights the presence of SARS-CoV-2 in various wild mammal species at the Belo Horizonte Zoo, emphasizing the virus's zoonotic potential and the complexity of interspecies transmission. The detection of different variants suggests ongoing viral evolution and adaptation in new hosts. Continuous monitoring and genomic surveillance of SARS-CoV-2 in wildlife are essential for understanding its transmission dynamics and preventing future zoonotic outbreaks. These findings underscore the need for integrated public health strategies that include wildlife monitoring to mitigate the risks posed by emerging infectious diseases.

Keywords Zoos, SARS-CoV-2, Wildlife, Mammals, Genomic analysis, Zoonotic transmission, Animal surveillance, Viral adaptation, Epidemiology

*Correspondence:

Júlia Angélica Gonçalves da Silveira
jangelicags@gmail.com
Renato Santana Aguiar
santanarnt@gmail.com

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.

RESEARCH

Open Access



Retrospective epidemiologic and genomic surveillance of arboviruses in 2023 in Brazil reveals high co-circulation of chikungunya and dengue viruses

Augusto César Parreiras de Jesus^{1,2†}, Paula Luize Camargos Fonseca^{3†}, Hugo José Alves³, Diego Menezes Bonfim³, João Victor Rodrigues Dutra³, Filipe Romero Rebello Moreira⁴, Cristiane Pinheiro Toscano de Brito Mendonça¹, Jéssica Silqueira Hickson Rios¹, Joice do Prado Silva¹, Frederico Scott Varella Malta¹, Isabela Braga-Paz³, João Locke Ferreira de Araújo³, Jaqueline Silva de Oliveira⁵, Carolina Senra Alves de Souza⁵, Sandra Elisa Barbosa da Silva⁵, Danielle Costa Capistrano Chaves⁵, Renée da Silva Carvalho⁵, Eneida Santos de Oliveira⁶, Marisa de Oliveira Ribeiro⁷, Monica Barcellos Arruda⁷, Patricia Alvarez⁷, Rennan Garcias Moreira³, Renan Pedra de Souza³, Danielle Alves Gomes Zauli¹ and Renato Santana Aguiar^{3,8*}

Abstract

Background The rapid spread and increase of chikungunya (CHIKV) and dengue (DENV) cases in Brazilian regions in 2023 has raised concerns about the impact of arboviruses on public health. Epidemiological and genomic surveillance was performed to estimate the introduction and spread of CHIKV and DENV in Brazil.

Methods This study obtained results from the Hermes Pardini (HP), a private medical laboratory, and the Health Department of Minas Gerais state (SES-MG). We investigated the positivity rates of CHIKV and DENV by analyzing the results of 139,457 samples tested for CHIKV (44,029 in 2022 and 95,428 in 2023) and 491,528 samples tested for DENV (163,674 in 2022 and 327,854 in 2023) across the five representative geographical regions of Brazil. Genome sequencing was performed on 80 CHIKV and 153 DENV samples that had been positive for RT-PCR tests.

Results In our sampling, the data from CHIKV tests indicated that the Northeast region had the highest regional positivity rate in 2022 (58.1%). However, in 2023, the Southeast region recorded the highest positivity rate (40.5%). With regard to DENV, the South region exhibited the highest regional positivity rate in both 2022 (40.8%) and 2023 (22.7%), followed by the Southeast region in both years (34.8% in 2022; 21.4% in 2023). During the first 30 epidemiological weeks of 2023 in the state of Minas Gerais (MG), there was a 5.8-fold increase in CHIKV cases and a 3.5-fold increase in DENV compared to the same period in 2022. Analysis of 151 new DENV-1 and 80 CHIKV genomes revealed the presence of three main clusters of CHIKV and circulation of several DENV lineages in MG. All CHIKV clades

[†] Augusto César Parreiras de Jesus and Paula Luize Camargos Fonseca contributed equally.

*Correspondence:
Renato Santana Aguiar
santanarnt@gmail.com

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s) 2024. **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution-NonCommercial-NoDerivatives 4.0 International License, which permits any non-commercial use, sharing, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if you modified the licensed material. You do not have permission under this licence to share adapted material derived from this article or parts of it. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by-nc-nd/4.0/>.