

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-graduação em Biologia Celular

Ana Carolina Carvalho Silva

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE miRNA ALTERADOS NO PLASMA DE
PACIENTES INFECTADOS COM O VÍRUS ZIKA**

Belo Horizonte
2022

Ana Carolina Carvalho Silva

**AVALIAÇÃO DO PERFIL DE miRNA ALTERADOS NO PLASMA DE PACIENTES
INFECTADOS COM O VÍRUS ZIKA**

Tese de doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular como requisito parcial para obtenção do título de Doutor.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Ludmila Rodrigues
Pinto Ferreira Camargo

Belo Horizonte
2022

043

Silva, Ana Carolina Carvalho.

Avaliação do perfil de miRNA alterados no plasma de pacientes infectados com o vírus Zika [manuscrito] / Ana Carolina Carvalho Silva. – 2022.

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

Orientadora: Prof.^a Dr^a Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo.

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

1. Biologia Celular. 2. Infecção por Zika virus. 3. MicroRNAs. I. Camargo, Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. III. Título.

CDU: 576



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
 INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
 PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR

ATA DA DEFESA DE TESE DE DOUTORADO DE ANA CAROLINA CARVALHO SILVA

246/2022 _ ENTRADA 2ª/2017 _ 2017757599

Às quatorze horas do dia 30 de março de 2022, reuniu-se, no Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, a Comissão Examinadora da Tese, indicada pelo Colegiado do Programa, para julgar, em exame final, o trabalho final intitulado: "AVALIAÇÃO DO PERFIL DE MIRNA ALTERADOS NO PLASMA DE PACIENTES INFECTADOS COM O VÍRUS ZIKA ", requisito final para obtenção do grau de Doutora em Biologia Celular. Abrindo a sessão, a Presidente da Comissão, **Dra. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo**, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após, a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição de resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações:

Prof./Pesq.	Instituição	Indicação
Dra. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo	UFMG	Aprovada
Dr. Vinicius de Toledo Ribas	UFMG	Aprovada
Dr. Frederico Marianetti Soriani	UFMG	Aprovada
Dr. Vagner Oliveira Carvalho Rigaud	Temple University, USA	Aprovada
Dr. Antonio Edson Rocha Oliveira	UNIFOR	Aprovada

Pelas indicações, a candidata foi considerada: Aprovada

O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar, a Presidente encerrou a reunião e lavrou a presente ATA, que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. **Belo Horizonte, 30 de março de 2022.**

Drª. Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo

Dr. Vinicius de Toledo Ribas

Dr. Frederico Marianetti Soriani

Dr. Vagner Oliveira Carvalho Rigaud

Dr. Antonio Edson Rocha Oliveira

Obs: Este documento não terá validade sem a assinatura do Coordenador



Documento assinado eletronicamente por **Vinicius de Toledo Ribas, Professor do Magistério Superior**, em 03/04/2022, às 21:21, 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 **Frederico Marianetti Soriani, Professor do Magistério Superior**, em 03/04/2022, às 22:18, 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 **Fernanda Radicchi Campos Lobato de Almeida, Coordenador(a)**, em 04/04/2022, às 09:16, 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 **Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira Camargo, Professora do Magistério Superior**, em 04/04/2022, às 10:33, 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 **Vagner Oliveira Carvalho Rigaud, Usuário Externo**, em 04/04/2022, às 11:00, 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 **Antônio Edson Rocha Oliveira, Usuário Externo**, em 04/04/2022, às 12:56, 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 **1355648** e o código CRC **C16A9486**.

RESUMO

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* geralmente transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. A apresentação clínica do ZIKV não é específica (febre, rash cutâneo, artralgia, mialgia, anorexia e astenia) podendo ser confundida com outras doenças, especialmente dengue e chikungunya. Em 2015 relatou-se os primeiros casos de infecção com ZIKV no Brasil assim como a associação da infecção com o desenvolvimento de microcefalia e da síndrome Guillain-Barré. Os mecanismos imunológicos e moleculares relacionados à resposta a infecção com ZIKV ainda precisam ser elucidadas. A identificação de mecanismos moleculares responsáveis pela modulação, no hospedeiro, de diversas vias em resposta ao ZIKV é o primeiro passo para que se encontrem alvos terapêuticos em potencial para o controle da infecção e tratamento dos sintomas. Na última década foi demonstrado que microRNAs (miRNAs), pequenas moléculas de RNA de 22 nucleotídeos, estão envolvidas na regulação da expressão gênica de virtualmente todos os processos celulares. Os miRNAs também têm sido identificados como importantes biomarcadores plasmáticos, pois são secretados pelas células ou liberados durante dano tecidual e infecções. Sabe-se que diferentes infecções virais induzem uma alteração no perfil de expressão de miRNAs circulantes no plasma de pacientes infectados. Entretanto, ainda não existem trabalhos que estudaram a importância e alteração desses miRNAs durante a infecção com ZIKV. Neste trabalho nós avaliamos o perfil de miRNAs circulantes em amostras de plasma que foram coletadas de pacientes nas fases aguda e de convalescência da infecção por ZIKV e de pacientes saudáveis provenientes da mesma região endêmica. O perfil de miRNAs dos grupos foi obtido e analisado. Observamos que a infecção com ZIKV causou alterações no perfil de miRNAs circulantes, como esperado. Esse perfil foi distinto dos pacientes convalescentes e dos pacientes saudáveis. Por meio da utilização de ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas predizemos alvos em potencial dos miRNAs alterados assim como vias de sinalização que estes potencialmente controlam. Dentre os vinte e quatro miRNAs diferencialmente expressos (DEMs), destacamos os miR-146, miR-125a-5p, miR-30-5p e miR-142-3p identificados e relacionados a vias de sinalização moduladas durante a infecção. Os resultados aqui apresentados são um esforço para abrir novos caminhos para os principais papéis dos miRNAs durante a infecção pelo ZIKV.

Palavras – chave: Vírus ZIKA; miRNA; Biologia de Sistemas.

ABSTRACT

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus member of the family Flaviviridae and genus Flavivirus generally transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. The clinical presentation of ZIKV is not specific (fever, skin rash, arthralgia, myalgia, anorexia and asthenia) and can be confused with other diseases, especially dengue and Chikungunya. In 2015, the first cases of ZIKV infection in Brazil were reported, as well as the association of the infection with the development of microcephaly and Guillain-Barré syndrome. The immunological and molecular mechanisms related to the response to infection with ZIKV have yet to be elucidated. The identification of molecular mechanisms responsible for the modulation, in the host, of several pathways in response to ZIKV is the first step towards finding potential therapeutic targets for the control of infection and treatment of symptoms. In the last decade it has been demonstrated that microRNAs (miRNAs), small RNA molecules of 22 nucleotides, are involved in the regulation of gene expression in virtually all cellular processes. miRNAs have also been identified as important plasma biomarkers, as they are secreted by cells or released during tissue damage and infections. It is known that different viral infections induce a change in the expression profile, as well as in the content of miRNAs circulating in the plasma of infected patients. However, there are still no studies that have studied the importance and alteration of circulating miRNAs during infection with ZIKV. In this work, we evaluated the circulating miRNAs profiles of plasma samples that were collected from patients in the acute and convalescent phases of ZIKV infection and from healthy individuals in the same endemic region. The miRNA profile of the groups was obtained and analyzed. We observed that infection with ZIKV caused changes in the profile of circulating miRNAs, as expected. This profile was different from convalescent patients and healthy patients. Using bioinformatics and systems biology tools, we predict potential targets of altered miRNAs as well as the signaling pathways they potentially control. Among the twenty-four differentially expressed miRNAs (DEMs), we highlight miR-146, miR-125a-5p, miR-30-5p and miR-142-3p identified and related to signaling pathways modulated during infection. The results presented here are an effort to open new avenues for the key roles of miRNAs during ZIKV infection.

Keywords: ZIKA virus; miRNA; System Biology.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Estrutura da partícula viral de ZIKV.....	13
Figura 2 – Ciclo de multiplicação dos Flavivirus.....	15
Figura 3 – Biogênese dos miRNAS.....	17
Figura 4 – Figura 4 - MiRNAs circulantes no sangue podem estar associados a HDL, LDL, exossomos, micropartículas e complexos proteicos.....	17

LISTA DE FIGURAS DO ARTIGO

Figure 1 A-B - Workflow and unsupervised analysis of miRNAs.....	48
Figure 2 A to D - Profiling of differentially expressed miRNA in ZIKV+, RECZIKV+, healthy individuals and their targets numbers	49
Figure 3 - Ingenuity Pathway Analysis (IPA) canonical pathways most significantly enriched in the ZIKV+ (blue color); RECZIKV+ (yellow color); Both groups (green color).....	50
Figure 4 - DEMs and molecules networks related to Senescence pathway regulation in ZIKV+. Network were built using IPA software... ..	51
Figure 5 - DEMs and molecules networks related to Oncostatin M pathway regulation in RECZIKV+. Network were built using IPA software.	52
Figure 6 A-B - Evaluation of miR-142-3p in the ZIKV +, RECZIKV + and Healthy group.....	53
Figure 7 - Network of miR-142-3p to Virus entry via endocytic pathway.....	54

LISTA DE TABELA

Table 1 - Characteristics of individuals/patients from the miRNA profiling cohort	47
Supplementary Table 1 - Clinical characteristics of the cohort study subjects.....	55
Supplementary Table 2 - List of target of the DEMs in ZIKV+.....	56
Supplementary Table 3 - List of DEMs in RECZIKV+	57
Supplementary Table 4 - List of DEMs in common between ZIKV+ and RECZIKV+.	58.

LISTA DE ABREVIATURAS

A. aegypti	<i>Aedes aegypti</i>
A. albopictus	<i>Aedes albopictus</i>
A. hensilli	<i>Aedes hensilli</i>
A. polynesiensis	<i>Aedes polynesiensis</i>
AIDS	Síndrome de Imunodeficiência Adquirida
C. elegans	<i>Caenorhabditis elegans</i>
CAAP	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
CHKV	Vírus Chikungunya
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
DEMs	Differentially expressed miRNAs
DENV	Vírus Dengue
ELISA	Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay
HIV	Vírus da Imunodeficiência Humana
HCV	Vírus da Hepatite C
IFN- β	Interferon-beta
IFN- α	Interferon-alpha
IPA	Ingenuity Pathway Analysis
mRNA	RNA mensageiro
miRNA ou miR	microRNA
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
RISC	RNA-induced silence complex
RNA	Ácido Ribonucleico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TLR3, 7 ou 9	Toll-like Receptor 3, 7 ou 9
3' UTR	Região 3' não traduzida
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

1 REFERENCIAL TEÓRICO	12
1.1 Zika, um vírus emergente	12
1.2 Transmissão e Manifestações Clínicas	12
1.3 Microcefalia causada pelo Vírus ZIKA	15
1.4 Diagnóstico	18
1.5 Biologia dos Flavivírus e fisiopatologia da infecção por Zika vírus	20
1.6 Ciclo de Multiplicação Viral	22
1.7 Biogênese, função dos microRNAs	25
1.8 MiRNAs circulantes em fluidos corporais	27
1.9 A modulação da interação vírus - hospedeiro pelos MiRNAs	30
2 JUSTIFICATIVA	32
3 OBJETIVOS	34
3.1 Objetivos Geral	34
3.2 Objetivos Específicos	34
ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO	35
ANEXO A	73
REFERÊNCIAS	77
CONGRESSOS E PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO	81

1 REFERENCIAL TEÓRICO

1.1 Zika, um vírus emergente

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus membro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* pertencentes a duas linhagens, Africana e Asiática. O vírus é geralmente transmitido por mosquitos do gênero *Aedes* para macacos, sendo os seres humanos hospedeiros ocasionais. Este vírus recebeu o nome do local de onde foi isolado pela primeira vez em 1947, na floresta Zika próxima de Entebbe na República de Uganda (HAMEL *et al.*, 2015; HAYES, 2009 ; DICKa *et al.*, 1952; DICKb *et al.*,1952). Os primeiros relatos de doença humana causada pelo ZIKV aconteceram na Nigéria em 1953 (MACNAMARA, 1994) e Uganda em 1964 (SIMPSON 1964). A primeira epidemia fora da África foi descrita em 2007, na Micronésia, onde foram identificadas 185 suspeitas de casos, sendo 49 casos confirmados e 59 casos prováveis confirmados (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Embora o ZIKV tenha sido descoberto a mais de 60 anos, apenas 14 casos humanos haviam sido reportados antes de 2007, e após esta data surgiram quatro principais surtos: na ilha de Yap, Polinésia Francesa, Nova Caledônia. Os primeiros casos de infecção por ZIKV no continente americano foram no Brasil em maio de 2015, seguido pela Colômbia, El Salvador, Guiana Francesa, Guatemala, Honduras, México, Panamá, Paraguai, Suriname e Venezuela. Dados da Organização Mundial de Saúde (OMS) estimam que em 2018 ocorreram aproximadamente 1 milhão de pessoas infectadas com ZIKV nas Américas, sendo 19,000 somente no Brasil (WHO, 2018).

1.2 Transmissão e Manifestações Clínicas

Entre os hospedeiros silvestres do ZIKV estão os primatas não humanos e espécies do mosquito *Aedes*. No ambiente urbano ocorre a transmissão para humanos por meio dos mosquitos das espécies *A. aegypti*, *A. albopictus*, *A. hensilli* e *A.*

polynesiensis. Sendo que *A.aegypti* e *albopictus* são encontrados nas Américas e as duas últimas, são vetores encontrados apenas nas ilhas Yap e Polinésia Francesa (CHOUIN-CARNEIRO *et al.*, 2016; PETERSEN *et al.*, 2016). Relatos e alguns estudos demonstraram que a transmissão também pode ocorrer da mãe para o feto durante a gravidez, com a identificação do RNA viral no líquido amniótico e leite materno (CALVET *et al.*, 2016; JOUANNIC *et al.*, 2016). Também já foi confirmada a possibilidade de transmissão sexual por meio da detecção do RNA viral no sêmen por períodos prolongados (MUSSO *et al.*, 2015). Ainda não foi adotada a detecção específica para ZIKV em bancos de sangue, representando uma forma de transmissão que preocupa as autoridades de saúde.

Os vírus da família *Flaviviridae* conservam características de morfologia da partícula viral, organização do genoma e estratégias de multiplicação similares, contudo, possuem propriedades biológicas características e hospedeiros diversos (LINDENBACH *et al.*, 2007). A maioria dos vírus desta família é transmitida por picadas de mosquitos ou de carrapatos. Entre as espécies conhecidas de Flavivirus, as 27 transmitidas por mosquitos são subdividas em dois grandes grupos, de acordo com sua ecologia e manifestações clínicas em humanos (KRAMER & EBEL, 2003), os flavivirus encefalíticos, transmitidos por mosquitos do gênero *Culex* e tendo como hospedeiros naturais os pássaros, e os flavivirus viscerotrópicos, que incluem o vírus da dengue e da febre amarela, transmitidos por mosquitos do gênero *Aedes*, possuindo primatas como seus hospedeiros naturais (GUBLER, 2002). A transmissão do ZIKV ocorre principalmente através da picada da fêmea do mosquito do gênero *Aedes*. Além de outras vias como citado anteriormente.

Zika é uma doença exantemática com apresentação clínica semelhante à de outras infecções por arbovírus, como chikungunya e dengue. Após o contágio com o ZIKV, o período de incubação em humanos pode variar entre três e 12 dias, sendo que grande parte das infecções pode permanecer assintomática (DUFFY *et al.*, 2009; MUSSO *et al.*, 2014b; BROOKS *et al.*, 2016). A evolução para quadros sintomáticos pode apresentar uma variedade de sintomas, que nem sempre estão presentes conjuntamente. A infecção por ZIKV, quando sintomática, é normalmente caracterizada pelo aparecimento de exantema maculopapular; febre aguda (37,8 °C - 38,5 °C) autolimitada, com duração de dois a sete dias; artralgia; mialgia, dor de cabeça conjuntivite e/ou uveíte. Alguns sintomas como tosse, vômito, dor de garganta e dor retro orbitária, também já foram relatados (ARMSTRONG *et al.*, 2016; ECDC, 2016; ESTOFOLETE *et al.*, 2016; THOMAS *et al.*, 2016). Ao contrário de outras arboviroses, como a Dengue, não foram notificados sinais hemorrágicos em doentes infectados com ZIKV (DUFFY *et al.*, 2009; KWONG *et al.*, 2013). No entanto, complicações neurológicas, como microcefalia associada ao vírus em recém-nascidos e neuropatias periféricas foram descritas (OEHLER *et al.*, 2014; CALVET *et al.*, 2016; KLASE *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; MS, 2016; WHO, 2016). Os primeiros estudos sobre os casos de microcefalia fetal e sua associação à transmissão vertical do vírus e o aumento do número de casos de neuropatias periféricas, como a SGB, concomitante ao aumento do número de notificações de ZIKV sugeriram uma relação causal (DE PAULA *et al.*, 2016; MARTINES *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; VENTURA *et al.*, 2016). Somente em 2016 alguns trabalhos comprovaram a relação da infecção pelo vírus ZIKA e o desenvolvimento da microcefalia em modelos experimentais. Ressalta-se que a

ocorrência de microcefalia associada à infecção pelo ZIKV aumentou a vigilância a este tipo de má-formação, evidenciando que este tipo de evento era essencialmente subnotificado no Brasil antes da circulação do vírus.

1.3 Microcefalia causada pelo Vírus ZIKA

A microcefalia é caracterizada pela redução do perímetro cefálico devido à destruição de células neuronais que levam ao desenvolvimento inadequado do cérebro (PERVAIZ et al., 2021). As alterações no feto, podem ser detectadas por ultrassom, tomografia, ou por medições perimétricas cefálicas durante o pré-natal. A síndrome fetal de ZIKV assemelha-se às outras infecções de contágio transplacentário, associadas às malformações congênitas, como toxoplasmose, sífilis e rubéola, e devido a este conjunto de sinais e sintomas é denominada Síndrome Congênita do Vírus Zika (SCVZ) (KLASE et al., 2016; MIRANDAFILHO et al., 2016). As características comuns na microcefalia congênita incluem a desproporcionalidade facial em comparação com a cabeça e "cutis girata" (dobras do couro cabeludo, causadas pelo crescimento contínuo da pele à medida que o desenvolvimento cerebral diminui). Além disso, os recém-nascidos podem apresentar hiperreflexia, irritabilidade, tremores e convulsões, anormalidades auditivas e visuais. Neuroimagens frequentemente revelam calcificações, entre outras alterações, como hipoplasia do tronco cerebral e do cerebelo e ventriculomegalia (MIRANDAFILHO et al., 2016; MLAKAR et al., 2016; WHO, 2016e). O desenvolvimento da patologia encefálica e a infecção de células neurais dependem da habilidade do vírus para entrar no SNC e na célula, ou seja, da neuroinvasão e da neurovirulência (MCMINN, 1997). O tropismo para neurônios motores já foi descrito para vários flavivírus, como JEV, WNV, TBEV e DENV (SOLOMON, 2004; SIPS et al., 2012). Estudos detectaram a presença tanto do RNA de dengue vírus quanto de anticorpos

específicos anti-dengue em amostras de líquido cefalorraquidiano comprovando a possibilidade de neuroinvasão destes vírus (DOMINGUES et al., 2008; KUMAR et al., 2008). Inicialmente a relação causal entre vírus e doença foi atribuída a, provavelmente, ser consequência de mutações virais recentes, baseada na hipótese de que a ocorrência de mutações propicia a geração de amostras virais mais virulentas. Para outros membros da família Flaviviridae está bem estabelecido que mutações no gene que codifica a glicoproteína E do envelope viral aumentam a sua virulência e a sua capacidade de danificar o sistema nervoso central (SIPS et al., 2012). No sistema nervoso central podem ser visualizadas reação intracitoplasmática granular e ativação de micróglia e macrófagos, o que sugere a localização do vírus nos neurônios e a interferência da resposta imune do hospedeiro na patogênese da microcefalia (MLAKAR *et al.*, 2016). A epidemia de ZIKV nas Américas e a associação observada em anormalidades fetais (microcefalia) e patologia autoimune adulta (síndrome de Guillain-Barré) chamaram a atenção para esse patógeno (OLIVEIRA, *et al.*, 2016; MS, 2016a; WHO, 2016c). O alto número de casos no Brasil, principalmente na região nordeste, provocou uma rápida mobilização de especialistas em saúde pública. Após o aumento de casos de infecção por ZIKV, vários trabalhos começaram a sugerir uma correlação entre a infecção por e o aumento de números de casos de microcefalia infantil, observada durante o surto - o Brasil relatou uma alarmante cifra de 7.438 casos suspeitos de microcefalia pela 18ª semana epidemiológica de 2016; no entanto, apenas 1.326 destes casos foram confirmados como infecção congênita. Embora um número significativo de casos tivesse sido excluído desta associação, em 2017 o grupo do Prof. Jean Pierre.... demonstrou experimentalmente que camundongos bla bla bla.

a relação epidemiológica e resultados de pesquisas experimentais apoiam que há uma relação causal entre Infecção intrauterina de ZIKV e microcefalia primária fetal (CALVET *et al.*, 2016; CUGOLA *et al.*, 2016; KLASE *et al.*, 2016; MIRANDA-FILHO *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; SARNO *et al.*, 2016, WHO, 2016e). Vários estudos demonstraram a presença do vírus Zika no sistema nervoso central, em órgãos como rins e fígado em autópsias de recém-nascidos (WILEY; CHIMELLI, 2017), bem como no líquido amniótico de mulheres grávidas infectadas (CALVET *et al.*, 2016) e em modelos experimentais (CUGOLA *et al.*, 2016). Experimentos *in vivo* em embriões de camundongos demonstraram a transmissão vertical do ZIKV e confirmaram seu direcionamento seletivo para os progenitores neurais (GLADWYN-NG *et al.*, 2018). O mecanismo molecular da microcefalia induzida pelo vírus Zika foi proposto se iniciando na transmissão transplacentária durante o primeiro trimestre da gravidez e propagação do vírus em células progenitoras neurais humanas (hNPCs), onde a entrada é facilitada pelo receptor (proteína AXL) levando à sinalização e ativação imunológica nas células hospedeiras. A regulação negativa da neurogênese e a regulação positiva da apoptose em hNPCs levam à parada do ciclo celular e à morte dos neurônios em desenvolvimento ocasionando os distúrbios neurológicos, como a microcefalia (FAIZAN *et al.*, 2016). A doença neurológica causada pelo ZIKV parece ocorrer por meio de dois mecanismos diferentes dependentes do período gestacional. Quando a infecção ocorre no primeiro trimestre de gravidez, o vírus infecta células progenitoras neurais causando graves alterações do desenvolvimento, já infecções mais tardias foram associadas à infecção meníngea e lesões isquêmicas destrutivas do cérebro (WILEY; CHIMELLI, 2017).

1.4 Diagnóstico

O diagnóstico pode ser feito a partir amostras biológicas variadas como urina, sangue/soro, liquor, sêmen, saliva, líquido amniótico, líquido cefalorraquidiano, placenta, fragmentos de tecido (BARZON *et al.*, 2013; WHO, 2014; CAMPOS *et al.*, 2016; JURADO *et al.*, 2016; OLSON *et al.*, 2016). As metodologias empregadas no diagnóstico laboratorial da infecção por ZIKV têm baseado principalmente em ferramentas moleculares, por meio da detecção do material genético do vírus, pela técnica da Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-PCR), além de testes sorológicos, pela detecção de anticorpos dos tipos IgG e IgM, que devem ser interpretados com cautela devido à possibilidade de resposta cruzada com outros flavivirus (DUFFY *et al.*, 2009; BINGHAM *et al.*, 2016; HUZLY *et al.*, 2016; STETTLER *et al.*, 2016; VAN ESBROECK *et al.*, 2016). Métodos moleculares, baseados na detecção do RNA viral, devem ser realizados, preferencialmente, em amostras de até sete dias após o início dos sintomas, enquanto métodos sorológicos, para a detecção de anticorpos, devem ser realizados após quatro dias (IgM) ou após 15 dias (IgG) de início dos sintomas (PAHO, 2016).

Os métodos moleculares possuem sensibilidade e especificidade elevadas, dependendo do estágio da doença. Apesar de altamente confiáveis, possuem custo elevado, exigem infraestrutura e equipamentos sofisticados e equipe técnica capacitada. No sangue, a detecção deve ser feita em até 7 dias após o início dos sintomas, contudo, elevada carga viral em amostras de urina tem sido detectada em período mais prolongado da fase aguda (BARZON *et al.*, 2013; GOURINAT *et al.*, 2015; DRIGGERS *et al.*, 2016; PAHO, 2016). A detecção específica do ZIKV pela técnica de RTPCR é feita com iniciadores e sondas específicos para genes que codificam para as proteínas E, a junção membrana-envelope (M/E), envelope parcial

(pE) e a NS5 de ZIKV (FAYE et al., 2008; FAYE et al., 2013; BALM et al., 2012). Além dos testes de identificação do RNA ou de anticorpos, antígenos virais podem ser pesquisados em ensaios imunohistoquímicos com anticorpos monoclonais ou pela técnica de PCR em autópsia de tecidos. (BUCKLEY & GOULD, 1988; HAMEL et al., 2015). Ademais, o vírus pode ser isolado em técnicas de cultivo celular a partir de sangue humano, sêmen e urina (CAO-LORMEAU, 2014; FONSECA et al., 2104; MUSSO et al., 2105).

A sorologia de ZIKV é geralmente realizada por ELISA seguida pela confirmação por ensaio de neutralização por redução de placas (PRNT) (JOHNSON et al., 2000; MARTIN et al., 2000; KUNO, 2003; WHO, 2007; MAEDA & MAEDA, 2013). O PRNT é considerado o teste "padrão-ouro" para a detecção específica de anticorpos anti-Flavivirus, possuindo alta especificidade em infecções primárias (KUNO, 2003; LANCIOTTI et al., 2008 364). Contudo, é um teste dispendioso e deve ser realizado em laboratórios altamente especializados e regulamentados, devido à manipulação de vírus vivos (MUSSO & GUBLER, 2016).

Alguns testes imunocromatográficos estão disponíveis no mercado, no entanto, apesar de vantajosos em relação aos outros disponíveis pela praticidade, custo e rapidez no resultado, apresentam as mesmas desvantagens de resposta cruzada frente a outros flavivírus mostradas pelos testes sorológicos citados (LANCIOTTI et al., 2008; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016). A presença de reatividade cruzada com IgM de outros flavivírus, principalmente em infecções secundárias, tanto com IgM ELISA, quanto pelo PRNT (LANCIOTTI et al., 2008), dificulta a utilização destes métodos. Alguns estudos mostraram o aumento de anticorpos heterólogos para outros flavivírus, em infecções secundárias por vírus do mesmo grupo (THEILIER & CASALS, 1958; BEARCROFT, 1956).

O protocolo preconizado pela OMS, em caso de suspeita de ZIKV, deve ser feito em amostras de soro ou saliva de fase aguda, pela técnica de RT-PCR específico de ZIKV, ou pan-flavivírus com sequenciamento de produto de PCR em amostras positivas. Após a fase aguda a urina ainda pode ser utilizada para o diagnóstico. Se a avaliação pelos métodos moleculares for negativa, a sorologia pode ser considerada, no entanto, os resultados devem ser avaliados com cautela devido à possibilidade de reatividade cruzada. Neste caso, as coletas de amostras de soro devem ser feitas de forma pareada, em um intervalo de 4 semanas, e um resultado positivo de ZIKV IgM deve ser confirmado pelo método de PRNT (PAHO, 2016).

O diagnóstico de ZIKV associado às complicações neurológicas, como a SGB, é feito da mesma forma descrita previamente. Como, normalmente a suspeita de uma síndrome neurológica ocorre fora do período de viremia é recomendado que a detecção molecular seja realizada em amostras de urina, ou através da detecção de anticorpos IgM na amostra de soro por ELISA. Amostras de fluido cefalorraquidiano (CSF) devem ser consideradas (PAHO, 2016). Outros exames laboratoriais, menos específicos, como hemograma completo, bioquímicos e de urina, têm demonstrado alterações sanguíneas, como leucopenia, presença de linfócitos ativos, trombocitopenia, aumento dos níveis de transaminases (DUPONT-ROUZEYROL *et al.*, 2015; GOURINAT *et al.*, 2015), albuminemia e presença de pigmento biliar na urina (MACNAMARA *et al.*, 1954), que são alterações presentes em várias outras infecções virais. A realização do hemograma completo em todos os casos suspeitos de Zika é recomendada (MUSSO & GUBLER, 2016).

1.5 Biologia dos Flavivírus e fisiopatologia da infecção por Zika vírus

O ZIKV assim como membros do gênero Flavivírus possuem um tamanho em torno de 40-60 nanômetros e possuem um genoma composto de uma única fita de

RNA de polaridade positiva, contendo aproximadamente 11.000 nucleotídeos que codifica uma única poliproteína. 5'-C-prM-E-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3' clivada por enzimas da célula hospedeira, gerando 3 proteínas estruturais: (Capsídeo [C]– Precursor da Membrana [prM] – Envelope [E]) e 7 proteínas não estruturais (NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5) (GUZMAN *et al.*, 2015) (**Figura 1**).

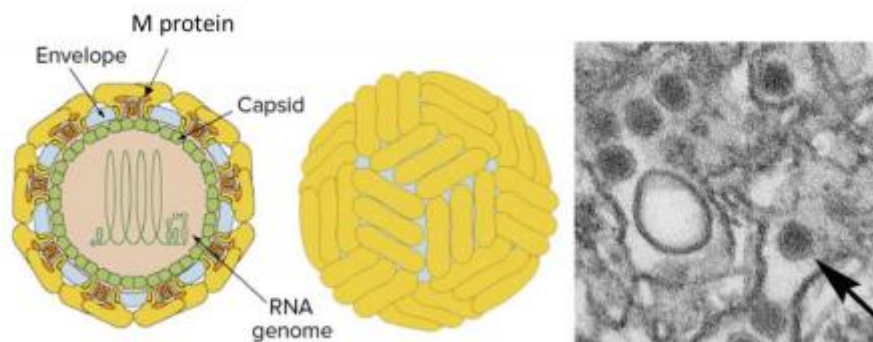


Figura 1: Estrutura da partícula viral de ZIKV. À esquerda desenho da estrutura da partícula de Zika vírus. A estrutura é composta pelo material genômico formado por RNA de fita simples e polaridade positiva (RNA genome) envolto pelas três proteínas estruturais: a proteína do envelope disposta em dímeros (Envelope); a proteína associada à membrana (M protein) e a proteína do nucleocapsídeo (Capsid). À direita, Microscopia de transmissão eletrônica (TEM) do vírus Zika. As partículas virais têm 42-52nm de diâmetro, com um envelope exterior e um núcleo denso interior. A seta identifica uma única partícula de vírus. Fonte: Adaptado de "Zika virus: Virion," por ViralZone, Swiss Institute of Bioinformatics (CC BY-NC 4.0); direita, "Zika virus," por C. Goldsmith, CDC Public Health Image Library.

De acordo com análises filogenéticas e do seu genoma, o ZIKV está relacionado com o vírus Spondweni e foram identificadas, até o momento, duas linhagens: Asiática e Africana, que estão intimamente relacionadas com o vírus Spondweni (CHAMBERS *et al.*, 1990; LINDENBACH; RICE, 2003; FARIA *et al.*, 2016; FAYE *et al.*, 2014; HADDOW *et al.*, 2012).

Após a transmissão do vírus pela picada do mosquito, estes são capazes de invadir células do sistema imune presentes na pele, incluindo fibroblastos, queratinócitos e células dendríticas interagindo com receptores de lectinas tipo C

como o DC-SIGN (Dendritic Cell-Specific Intracellular Adhesion Molecule-3-Grabbing Non-integrin) e receptores de fosfatidilserina TIM e TAM, AXL e Tyro3 presentes na superfície celular por meio de um mecanismo de endocitose mediada por receptores. Quanto ao reconhecimento pelo sistema imune inato observa-se padrões semelhantes ao observado em infecções por outros tipos de vírus, tais como o reconhecimento pelos receptores do tipo Toll (TLR3, TLR7 e TLR9) induzindo a produção de interferon do tipo I (IFN- α e IFN- β) (TAKEUCHI *et al.*, 2009). Ensaio utilizando IFN- α , IFN- β indicaram que o vírus Zika é altamente sensível aos efeitos antivirais dessas citocinas e animais knock-out para interferons do tipo I são altamente suscetíveis à infecção pelo ZIKV, reproduzindo a patologia cerebral grave e simulando características da infecção fetal humana (HAMEL *et al.*, 2015).

1.6 Ciclo de Multiplicação Viral

O ciclo de multiplicação dos Flavivirus, bem como para o ZIKV (Figura 2), se inicia pela infecção de células do hospedeiro permissivas aos vírus. As partículas virais se ligam às células através de interações entre a glicoproteína de superfície E do vírus e receptores celulares e penetram na célula hospedeira por um processo de endocitose mediada por receptor (GOLLINS; PORTERFIELD *et al.*, 1988; ISHAK *et al.*, 1988; NG; LAU, 1988; HAMEL *et al.*, 2015). Após ser internalizado na vesícula endossomal, a proteína E do vírus sofre modificações conformacionais, gerada pela variação do pH no interior da vesícula, expondo seu peptídeo de fusão que se funde a membrana lipídica do endossomo promove a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular (GOLLINS; PORTERFIELD *et al.*, 1988; HEINZ; STIASNY, 2006; CLYDE *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008) seguido da liberação e tradução do genoma de RNA polaridade positiva para produção de fitas positivas de cópias do genoma e das proteínas envolvidas na replicação viral, que

ocorre na superfície do retículo endoplasmático, como a NS5 – que tem função de RNA polimerase RNA-dependente (CLYDE *et al.*, 2006). Após ser internalizado na vesícula endossomal, a proteína E do vírus sofre modificações conformacionais, gerada pela variação do pH no interior da vesícula, expondo seu peptídeo de fusão que se funde a membrana lipídica do endossomo promove a liberação do nucleocapsídeo viral no citoplasma celular (GOLLINS; PORTERFIELD *et al.*, 1988; HEINZ; STIASNY, 2006; CLYDE *et al.*, 2006; YU *et al.*, 2008) seguido da liberação e tradução do genoma de RNA polaridade positiva para produção de fitas positivas de cópias do genoma e das proteínas envolvidas na replicação viral, que ocorre na superfície do retículo endoplasmático, como a NS5 – que tem função de RNA polimerase RNA-dependente (CLYDE *et al.*, 2006).

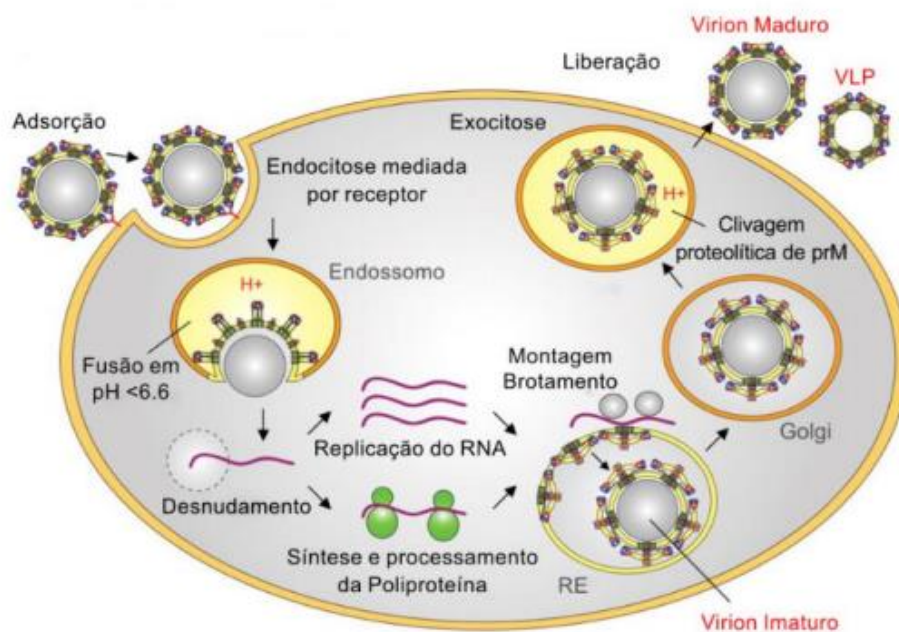


Figura 2: Ciclo de multiplicação dos Flavivirus. O vírus entra na célula por endocitose, através da ligação da proteína E do envelope viral a receptores presentes na superfície celular

do hospedeiro, o que medeia a internalização na célula. Dentro do endossomo as proteínas virais sofrem mudanças conformacionais proporcionadas pelo baixo pH do meio endossomal, promovendo a fusão entre o envelope e a membrana do endossomo. O RNA é liberado no citoplasma com o desnudamento do capsídeo viral e inicialmente traduzido em uma poliproteína que é processada dando origem às proteínas estruturais e não estruturais (para produzir as proteínas de replicação) do vírus. A replicação ocorre na superfície do retículo endoplasmático. Depois da síntese das proteínas estruturais, os vírions são montados sofrendo brotamentos intracelulares. As partículas imaturas seguem nas vias secretórias (aparelho de Golgi), sofrem maturação (clivagem da proteína prM) e são liberadas da célula por exocitose. RE: Retículo endoplasmático. VLP: Virus-like Particles. Fonte: HEINZ; STIASNY, 2006.

As três proteínas estruturais – E, prM e C; e 7 proteínas não-estruturais – NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5 serão sintetizadas a partir das fitas de RNA polaridade positiva traduzidas nos ribossomos, dando origem à poliproteína que será clivada e sofrerá processamento pós-traducional por proteases virais e celulares (RICE, 1996; LINDENBACH *et al.*, 2003). O vírus é montado no interior do retículo endoplasmático como uma partícula imatura constituída por heterodímeros de proteínas E: prM (ZHANG *et al.*, 2003; LINDENBACH; *et al.*, 2013) e é transportado para o aparelho de Golgi onde ocorre a maturação do vírus, no pH ácido da rede trans-Golgi, através de alterações conformacionais das glicoproteínas de superfície e clivagem por uma protease da célula hospedeira, a Furina. Nas partículas virais imaturas, a proteína prM é clivada, dando origem às formas maduras do vírus, ou seja, as formas passíveis de fusão e liberação por exocitose. Com a remoção do peptídeo “pr” durante a maturação, a proteína E fica exposta possibilitando o ciclo de fusão endossomal e secreção pela célula hospedeira. O vírus maduro é então constituído por heterodímeros diméricos de proteínas E: M (KUHN *et al.*, 2002; LINDENBACH *et al.*, 2003; YU *et al.*, 2008; ZHANG *et al.*, 2013; CORTESE *et al.*, 2017).

1.7 Biogênese, função dos microRNAs

O primeiro miRNA, denominado lin-4, foi descrito por Lee e colaboradores em 1993 em um trabalho que estudava a regulação gênica durante o desenvolvimento larval do nematódeo *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (LEE *et al.*, 1993). Essa molécula inibia a expressão do RNAm lin-14 se ligando a sua região 3' não traduzida (UTR). A hipótese inicial era de que esse mecanismo de regulação gênica era restrito ao *C. elegans*. Contudo, em 2000 identificou-se também o miRNA let-7 no processo de desenvolvimento de *C. elegans* (PASQUINELLI *et al.*, 2000). Foi demonstrado que ambas, a sequência do let-7, assim como sua expressão temporal, estavam presentes e amplamente conservadas em uma variedade de organismos, incluindo humanos, comprovando de que esses pequenos RNAs desempenhavam um papel importante na regulação gênica não restrita ao *C. elegans*. (PASQUINELLI *et al.*, 2000; REINHART *et al.*, 2000). Essa descoberta gerou intenso interesse na identificação de novos miRNAs. Em um estudo realizado no ano 2000 calculou-se que o genoma humano codifique mais de 3000 miRNAs (REINHART *et al.*). Atualmente, existem 2.588 miRNAs descobertos em humanos e anotados em banco de dados públicos como o miRBase (www.mirbase.org).

Os miRNAs são transcritos no núcleo, a partir de genes localizados em várias regiões do genoma. Eles estão regularmente encontrados em cluster e são transcritos de regiões intergênicas ou intragênicas (**Figura 3**). Genes de miRNAs isolados apresentam promotores próprios e estão geralmente localizados em regiões intergênicas. No entanto muitos miRNAs encontram-se agrupados, formando unidades policistrônicas, ou seja, unidades em que vários genes são controlados pelo mesmo promotor e assim, transcritos simultaneamente (ALVAREZ-BUYLLA *et al.*, 2007). Esses genes são transcritos preferencialmente pela RNA polimerase II dando

origem a um longo transcrito, denominado miRNA primário ou pri-miRNA (de primary miRNA), que sofre a adição de uma cauda poli A na extremidade 3' e de um cap 7-metil-guanosina na extremidade 5'.

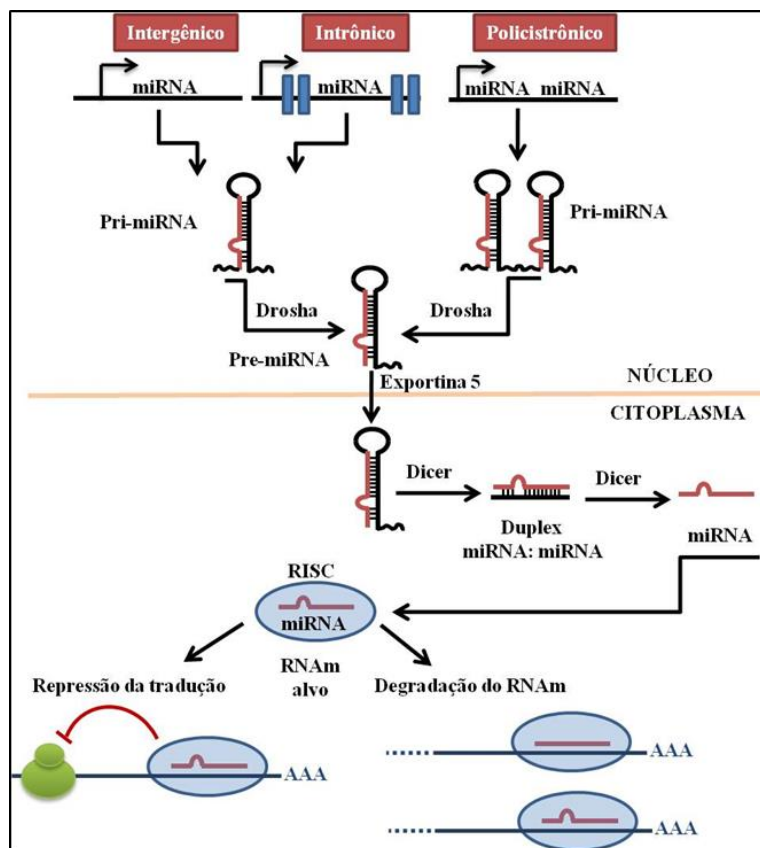


Figura 3 – Biogênese dos miRNAs. Figura adaptada de (ROOIJ, 2011). Os transcritos primários de miRNAs, chamados pri-miRNAs, são transcritos do núcleo a partir de genes de miRNA individuais, de íntrons de genes codificadores de proteínas ou de transcritos policitrônicos. A RNase Drosha processa ainda o pri-miRNA em precursores em forma de grampo de 70 a 100 nucleotídeos, chamados pré-miRNA, que são exportados do núcleo para o Citoplasma através da exportina 5. No citoplasma, o pré-miRNA é clivado pela Dicer em um duplex miRNA:miRNA. Após a montagem do complexo RISC, o miRNA maduro regula negativamente a expressão gênica por repressão traducional ou degradação do mRNA, que é dependente da complementaridade de sequência entre o miRNA e o mRNA alvo.

A seguir, esse pri-miRNA é processado por um complexo constituído por uma RNase do tipo III denominada Drosha que age juntamente com seu cofator DGCR8 (DiGeorge Syndrome critical region gene 8). Esse complexo cliva o pri-miRNA formando o pre-miRNA, um transcrito em forma de grampo (hairpin). Esse pre-miRNA é então exportado ao citoplasma pela ação de um complexo denominado Exportina-5/Ran-guanosina trifosfato (GTP). No citoplasma, esse pre-miRNA é

processado por outra RNase III, denominada Dicer, gerando um miRNA de fita dupla (ds-miRNA), do inglês double-stranded miRNA. Por fim, esse ds-miRNA se associa ao complexo multiprotéico RISC (RNA-induced silence complex). A fita desse ds-miRNA com baixa estabilidade no pareamento de bases em sua extremidade 5' é incorporada ao RISC, sendo que a outra fita é degradada. Após a seleção da fita simples do miRNA maduro, essa guia o RISC até o RNAm alvo. Após o pareamento específico desse miRNA maduro com sua sequência alvo há inibição da tradução ou degradação do RNAm (REINHART *et al.*, 2000; ACHKAR; CAMBIAGNO; MANAVELLA, 2016).

1.8 MiRNAs circulantes em fluidos corporais

Apesar de normalmente os miRNAs serem considerados moléculas que controlam a expressão gênica pós transcricional no ambiente intracelular, estes foram detectados circulantes em vários fluidos corporais como saliva, urina, soro e plasma sanguíneos de pessoas saudáveis ou doentes (MITCHELL *et al.*, 2008). Foi demonstrado que essas moléculas estão presentes circulantes estavelmente no plasma, protegidas de degradação por RNases. Observou-se que os miRNAs podem ser liberados pela célula de forma ativa, associados à lipoproteínas de alta densidade (HDL), à vesículas (exossomos, micropartículas) ou complexos proteicos (como as proteínas Argonauta 2 e nucleofosmina-NPM1) e de forma passiva em corpos apoptóticos resultantes de morte celular e dano tecidual (TIJSEN; PINTO; CREEMERS, 2012) (**Figura 4**).

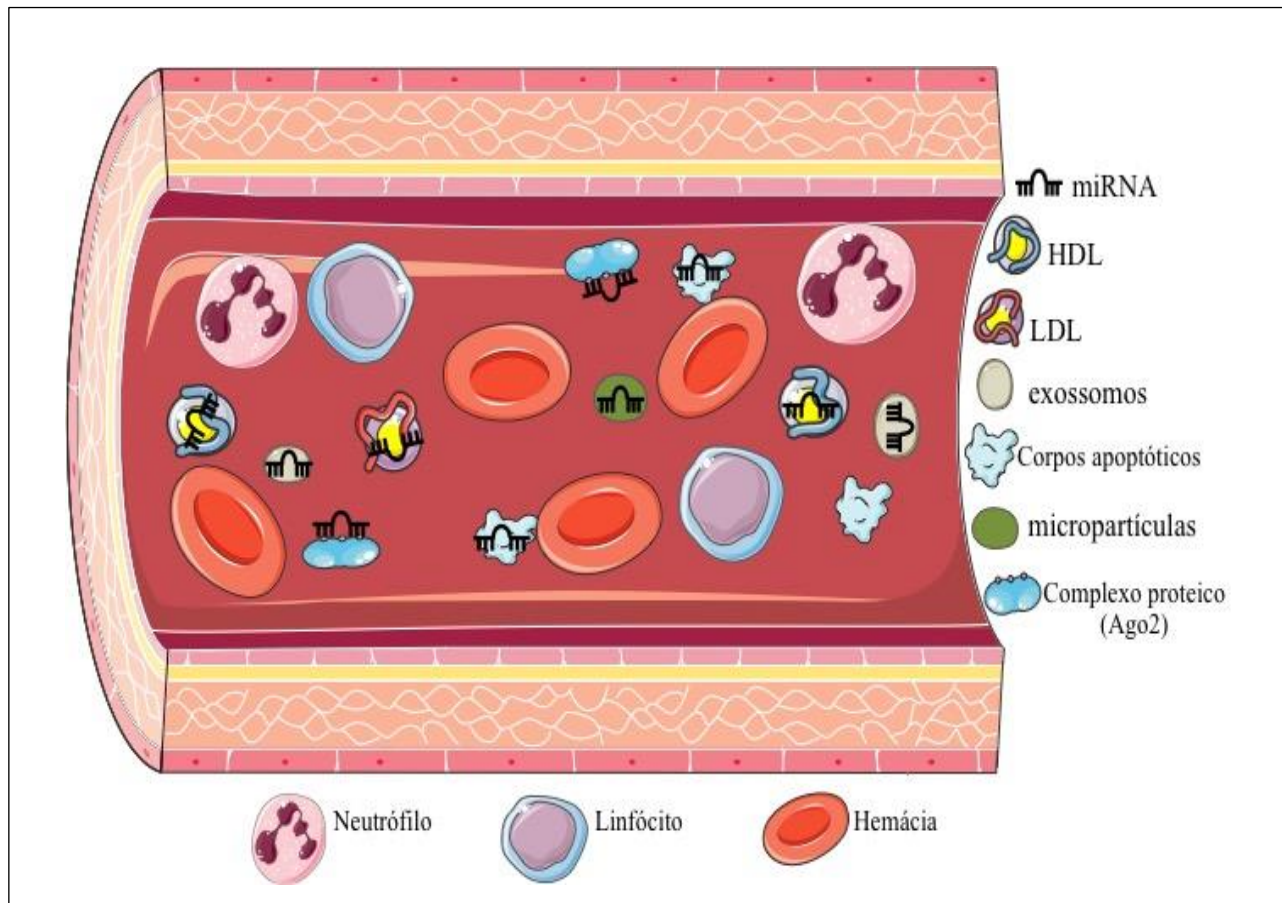


Figura 4 - MiRNAs circulantes no sangue podem estar associados a HDL, LDL, exossomos, micropartículas e complexos proteicos.

A primeira publicação que relata a detecção de miRNAs é de 2008, quando foi descrita a presença de miR-155 e miR-21 em quantidades diferentes no soro de pessoas saudáveis quando comparadas com pacientes com linfoma de células B. (LAWRIE *et al.*, 2008). Vários trabalhos em seguida, foram apresentados demonstrando miRNAs em diferentes líquidos biológicos, incluindo fluido seminal, colostro, urina, saliva, leite materno, lágrimas, líquido amniótico, secreção brônquica, plasma, líquido pleural, líquido peritoneal e líquido cefalorraquidiano (CORTEZ *et al.*, 2011). A presença de miRNAs nos diversos fluidos biológicos permite que essas moléculas possuam capacidade de transferência horizontal, passando entre diferentes tecidos e desempenhando função pleiotrópica, uma vez que podem causar efeitos biológicos a curtas e longas distâncias. O mecanismo de

seleção e liberação de miRNAs é controlado e implica em perfil específico em cada tipo fluido biológico, sendo que alterações em células distintas acarretam variações particulares, que podem ser exploradas como marcadores biológicos de condições fisiológicas ou patológicas (BRIEN; HEYDER; PENG, 2018). De fato, tem sido sugerido usar o perfil de miRNAs no plasma, no soro ou em outros fluidos corporais, para identificar ou monitorar a evolução de doenças e as respostas terapêuticas (CORTEZ, 2011). As principais vantagens do uso de miRNAs são alta especificidade e sensibilidade dessas moléculas, facilidade de obtenção de amostras e alta estabilidade. Isso facilita sua manipulação e favorece sua exploração como ferramenta importante para a medicina personalizada. No entanto, a falta de protocolos padronizados ainda limita seu uso na prática clínica, principalmente pela falta de normalizadores universais que permitam a quantificação de maneira que os resultados possam ser comparados (VALIHRACH; ANDROVIC; KUBISTA, 2019; CONDRAT *et al.*, 2020; LAMON; HIAM, 2020).

Os miRNAs circulantes foram encontrados como importantes marcadores em diversas doenças e condições patológicas. Os níveis circulantes dos miRNAs miR - 19b3p e miR -181b-5p foram associados com alterações metabólicas no miocárdio durante o desenvolvimento de cardiomiopatia diabética, sugerindo que estes miRNAs são biomarcadores potenciais com eventual aplicação no diagnóstico clínico para prevenir alterações metabólicas e funcionais em pacientes diabéticos assintomáticos (Copier *et al.*, 2017). Estudos de carcinoma de mama metastático demonstraram que o miR-30a e o miR-155 circulantes são melhores marcadores da doença comparados com marcadores sanguíneos gerais, antígeno carcinoembrionário (CEA) e antígeno carboidrato (CA) (Sun *et al.*, 2012; Zheng *et al.*, 2012; Zeng 2014). Na doença de Parkinson foi identificado e validado um painel

de miRNAs circulantes incluindo miR-19b, miR-24 e miR-195, com expressão diferencial no soro de pacientes, com forte suposição de que estas moléculas seriam capazes de permitir o diagnóstico da doença (Cao *et al.*, 2017).

1.9 A modulação da interação vírus - hospedeiro pelos MiRNAs

O fato de os miRNAs virais serem capazes de atuar como análogos de miRNAs celulares, é relevante quando se analisa a funcionalidade deles no contexto celular, uma vez que os alvos reconhecidos por eles podem ser oriundos do hospedeiro ou então derivados do próprio vírus. Os miRNAs virais análogos aos miRNAs do hospedeiro apresentam sequências “*seed*” similares aquelas observadas em seus correspondentes celulares. Simular as sequências “*seed*” dos miRNAs das células permite ao miRNA viral reconhecer os mesmos alvos, o que torna possível ao vírus uma regulação efetiva dos diferentes transcritos que estariam sob regulação do miRNA simulado (KINCAID; SULLIVAN, 2012).

A inibição da morte celular programada (apoptose), pode ser uma estratégia adotada por diversos vírus para prolongar os períodos de infecção no hospedeiro. A apoptose é um fenômeno cuja regulação envolve uma gama importante de diferentes miRNAs celulares (AMPOMAH; LIM. 2019). Diversos vírus animais codificam miRNAs análogos a miRNAs celulares associados a regulação da expressão de genes pró-apoptóticos. Tais como PUMA (*P53 up-regulated modulator of apoptosis*) promovendo assim uma resistência celular a apoptose. Outras espécies virais como *Kaposi's sarcoma-associated herpesvirus (KSHV)* codificam miRNAs que têm como alvos transcritos de genes envolvidos nos eventos iniciais e tardios do processo apoptótico, como os que codificam receptores específicos e as caspases (proteases aspárticas de cisteína) envolvidas na manutenção da homeostase através da regulação

da apoptose (morte) e inflamação das células (CHOY ET AL., 2008; KINCAID; SULLIVAN 2012).

2 JUSTIFICATIVA

Os miRNAs têm sido identificados como importantes na regulação da expressão de genes de diferentes tipos de vírus assim como na resposta do hospedeiro à infecções virais (TAHAMTAN *et al.*, 2016). MiRNAs circulantes têm sido identificados como biomarcadores não invasivos e de diagnóstico para várias infecções virais. Estudos recentes têm demonstrado que o perfil de miRNAs circulantes no soro e no plasma funcionam como uma assinatura molecular. Ouyang e colaboradores (2016) ao analisarem o soro de pacientes com dengue demonstraram que os miRNAs: hsa-miR-21-5p e hsa-miR-146a-5p distinguem com alta sensibilidade e especificidade pacientes saudáveis dos pacientes com a doença (OUYANG *et al.*, 2016). Inúmeros trabalhos abordaram a importância dos miRNAs na interação vírus-hospedeiro. Como exemplo o miR-146 que facilita a replicação do DENV-2 em monócitos humanos infectados. Este miRNA possui alvos importantes como TRAF6 e atuam inibindo a produção de IFN- β . O hsa-miR-122, facilita a replicação do vírus da hepatite C (HCV), uma vez que, ao ser inibido, promove significativa redução da quantidade de partículas virais produzidas pelos hepatócitos (JOPLING *et al.*, 2012). Trabalhos recentes demonstraram a participação de miRNAs durante a infecção *in vitro* e *in vivo* por Zika: Azouz e colaboradores (2019) demonstraram que neurônios de cultura quando infectados com ZIKV possuem uma expressão diferencial dos seguintes miRNAs: miR-155, miR-203, miR-29a, e miR-124-3p (AZOUZ *et al.*, 2019). Além disso, esse estudo demonstrou uma diminuição na expressão de enzimas e proteínas relacionadas a biogênese de miRNAs. Iannolo e colaboradores (2019) demonstrou que a infecção de células de glioblastoma com ZIKV induz um aumento na expressão de miR-34c, e que a indução da expressão desse miRNA se trata de forma de tratamento em potencial, de tumores cerebrais.

Um outro trabalho também de 2019, demonstrou que os miRNAs: miR-145 e miR-148a estão aumentados numa linhagem de neuroblastoma, e validaram a expressão destes em amostras de cérebro de natimortos infectados com ZIKV (CASTRO *et al.*, 2019). Ainda não existem trabalhos avaliando a expressão de miRNAs em pacientes infectados com ZIKV. Também nada foi visto em relação aos miRNAs circulantes e seu papel durante a infecção com Zika.

Nossa hipótese inicial de trabalho era que a infecção causaria alterações detectáveis no perfil de miRNAs circulantes plasmáticos e que essa expressão teria uma correlação direta com mudanças na expressão de diferentes genes alvos desses miRNAs, principalmente aqueles relacionados com a resposta imunológica do paciente. Além disso pretendíamos encontrar diferenças na expressão de miRNAs quando comparássemos pacientes na fase aguda da infecção com aqueles já na fase de convalescência.

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivo geral

Caracterizar o perfil de miRNAs circulantes no plasma de pacientes infectados pelo ZIKV.

3.2 Objetivos específicos:

1. Caracterizar e comparar o perfil de miRNAs plasmáticos
2. Com a lista de miRNAs diferenciais de cada grupo, pretendemos utilizar ferramentas de bioinformática e biologia de sistemas para:
 - a. Identificar vias canônicas potencialmente envolvidas na resposta a infecção.
 - b. Avaliar vias enriquecidas em cada grupo, determinando a importância de moléculas envolvidas na resposta a infecção.

ARTIGO ACEITO PARA PUBLICAÇÃO
FRONTIERS IN GENETICS

1 **A major downregulation of circulating microRNAs in Zika acutely infected**
2 **patients: potential implications in Innate and Adaptive Immune Response**
3 **Signaling Pathways.**

4

5 **Running title:** Plasma miRNA profiling in Zika infection.

6

7 Ana Carolina Carvalho-Silva^{1,2,¥}, Almir Ribeiro da Silva Junior^{3,4,5¥}, Vagner
8 Oliveira-Carvalho Rigaud³, Waleska Martins Gardesani^{6,7}, Verônica Coelho^{3,4,5},
9 Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer⁸, Jorge Kalil^{3,4,5}, Simone da Fonseca⁹, Edecio
10 Cunha-Neto^{3,4,5} &, Ludmila Rodrigues Pinto Ferreira^{1,2,&}, ^{□¥} *Authors* contributed
11 equally *to this work*

12 [&] Both senior authors contributed equally *to this work*.

13 ¹ RNA Systems Biology Laboratory (RSBL), Departamento de Morfologia, Instituto de
14 Ciências Biológicas, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, MG,
15 Brazil.

16 ² Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular, Universidade Federal de Minas
17 Gerais (UFMG), Belo Horizonte, MG, Brazil.

18 ³ Laboratory of Immunology, Heart Institute (InCor) School of Medicine, University of
19 São Paulo, São Paulo, Brazil.

20 ⁴ Institute for Investigation in Immunology, iii – INCT (National Institute of Science
21 and Technology), São Paulo, Brazil

22 ⁵ Division of Clinical Immunology and Allergy, School of Medicine, University of São
23 Paulo, São Paulo, Brazil.

24 ⁶ Instituto de Química, Universidade de São Paulo, São Paulo, SP, Brazil.

25 ⁷ Universidade Anhanguera, São Paulo, SP, Brazil.

26 ⁸ Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

27 ⁹ Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública, Universidade Federal de Goiás,

28 Goiania, GO, Brazil.

29 ¹⁰ National Institute of Science and Technology for Vaccines (INCTV).

30 ¹¹ Centro de Tecnologia de Vacinas, Universidade Federal de Minas Gerais. (CT-

31 Vacinas/UFMG).

32  **Corresponding author:**

33 Ludmila Rodrigues P. Ferreira, RNA Systems Biology Laboratory, Department of

34 Morphology, ICB, Universidade Federal de Minas Gerais. Av. Antônio Carlos, 6627 -

35 Campus Pampulha. Bloco J4, sala 158. Belo Horizonte, MG Brazil. 31270-910. E-mail:

36 ludmila@icb.ufmg.br.

37 **ABSTRACT**

38 Zika virus (ZIKV) is an arbovirus mainly transmitted by mosquitos in the genus *Aedes*.
39 The first cases of ZIKV infection in South America occurred in Brazil in 2015. The
40 infection in humans causes diverse symptoms, from asymptomatic to a syndrome like
41 dengue infection, with fever, arthralgia and myalgia and there is a confirmed association
42 between ZIKV infection during pregnancy and fetal microcephaly, and neurological
43 disorders. The identification of host molecular mechanisms responsible for the
44 modulation of different signaling pathways in response to ZIKV is the first step to find
45 potential biomarkers, therapeutic targets and to understand disease outcomes. In the last
46 decade it has been shown that microRNAs (miRNAs) are important post-transcriptional
47 regulators involved in virtually all cellular processes. MiRNAs present in body fluids
48 can contribute to cellular signaling and were proved as key biomarkers for diagnostic
49 and prognostic in human disorders offering new insights into pathological mechanisms.
50 Here, we describe for the first time ZIKV-induced changes in circulating miRNA
51 populations of patients during acute and recovery phase of infection. We observed that
52 during ZIKV acute infection, circulating miRNAs are mainly downregulated compared
53 to convalescent and healthy patients. We used system biology tools to build and
54 highlight biological interactions between miRNAs and their multiple direct and indirect
55 target molecules. Among the twenty-four differentially expressed miRNAs (DEMs)
56 identified in plasma o patients infected with ZIKV, miR-146, miR-125a-5p, miR-30-5p
57 and miR-142-3p are related to signaling pathways modulated during infection and
58 immune response. The results presented here are an effort to open new vistas for the key
59 roles of miRNAs during ZIKV infection.

60 **KEYWORDS:** Zika infection; microRNAs profiling; system biology, viruses, target
61 prediction.

62 INTRODUCTION

63 The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus member of the Flaviviridae family that can be
64 carried and spread by mosquitoes belonging to the genus *Aedes*. The first Zika epidemic
65 in South America occurred in 2015 in northeastern states of Brazil [1; 2; 3]. About one
66 in five people infected with the Zika virus become symptomatic, with characteristic
67 clinical symptoms like acute onset fever with rash, arthralgia, and conjunctivitis. Other
68 commonly reported symptoms include myalgia, headache, retroorbital pain, and
69 vomiting[4; 5]. Previous studies have shown that ZIKV has a neuronal and glia tropism
70 and can be also associated with neurological disorders (e.g. Guillain–Barré syndrome
71 and myelitis) [4]. Identification of viral RNA in amniotic fluid and maternal milk
72 demonstrated that transmission may also occur from mother to fetus during pregnancy
73 with devastating consequences impacting the developing fetal brain causing dysfunction
74 and microcephaly [6]. Knowledge about the pathogenesis of ZIKV infection is still
75 limited and there is an urgent scientific community effort to understand, develop and
76 identify factors associated to clinical outcomes. MicroRNAs (miRNAs or miRs) are
77 single stranded noncoding RNA molecules of ~22 nucleotides in length capable of gene
78 expression control at transcriptional and translational level by repressing target mRNAs
79 [7; 8]. MiRNAs have been detected stably circulating in various body fluids, such as
80 saliva, urine, serum and plasma of healthy or diseased individuals, consequently, can be
81 used as non-invasive diagnostic and prognostic biomarkers [9; 10]. Here, we describe
82 for the first time the circulating miRNAs profiling in plasma samples from ZIKV
83 infected individuals during acute (ZIKV+) and recovery phase (RECZIKV+) compared
84 to healthy donors, residents from the same endemic area (Healthy). We have found that
85 ZIKV+ patients had a significant number of differentially expressed miRNAs (DEMs)
86 in plasma, with most of them downregulated compared to RECZIKV+ and Healthy

87 individuals. To better understand and predict the potential impact of this miRNA
88 dysregulation during Zika infection we used computational analysis to identify the
89 potential targets of the dysregulated miRNAs (DEMs TARGETs) and used the obtained
90 list of targets to perform pathways enrichment and functional analysis and also found
91 the potential upstream regulators of this miRNA dysregulation during Zika infection.
92 Finally, DEMs-targets networks were built, and central node molecules were found at
93 ZIKV+ and RECZIKV+ networks around the main enriched canonical pathways
94 observed for each group. We present here a holistic view and highlighted the potential
95 role of circulating miRNAs during response to acute infection and the disease recovery
96 phase of ZIKV infection.

97

98 MATERIALS AND METHODS

99 *Ethics Statement*

100 This study was approved by the Institutional Review Board from Pontifical Catholic
101 University of Goiás (CEP - Research Ethics Committee), under the protocol number
102 46073815.9.0000.00370. All subjects were invited to participate in the study after being
103 explained about the research and were at least 18 years old. All study subjects signed a
104 written informed consent form before the interview and blood collection in accordance
105 with the Declaration of Helsinki and the ones with Zika fever-like symptoms were also
106 interviewed in a private room and answered a written questionnaire informing about the
107 day of symptom onset, types of symptoms and demographic information.

108 *Study cohort and blood sample collection*

109 Our study cohort included a total of 52 individuals aged 18–68 years (mean 36 years).
110 from Goiânia city, State of Goiás (GO), Brazil. All individuals were tested negative for
111 dengue and chikungunya. From these 52 participants (Supplementary Table 1): 25 were
112 healthy potential blood donors recruited from the Center of Serology and
113 Immunohematology of Goiânia - GO – Brazil, aged between 27-53 years (mean, 36.4
114 years) and displaying negative blood tests for several infectious diseases (Healthy).
115 Twenty-seven showed Zika fever-like acute symptoms during the outbreak of ZIKV
116 infection in Brazil between January to May 2016. All 27 patients were positive for
117 ZIKV at real-time RT-PCR test (ZIKV+). A first blood collection of ZIKV-infected
118 subjects was done at enrollment, 2 to 9 days after symptom onset. A second blood
119 collection were done from 6 ZIKV-infected subjects at 2 to 3 weeks after the first
120 sample, for evaluating the recovery phase (RECZIKV+) (Table 1). From these samples
121 we randomly selected a total of 18 samples for miRNA profiling: 6 healthy individuals

122 (Healthy), 7 ZIKV+ and 5 RECZIKV+ patient samples. Blood samples were collected
123 into EDTA-coated Vacutainer tubes (Becton & Dickinson, USA), samples were
124 centrifuged at 1200 rpm for 10 min, and the plasma was separated and stored at -80°C
125 freezer until the analysis.

126 ***Detection of ZIKV infection by Real time RT-PCR***

127 RNA samples were extracted from whole blood samples using the QIAamp Viral RNA
128 Mini Kit (Qiagen, Hilden, Germany), according to the manufacturer's instructions.
129 Real-time RT-PCR for Zika virus was performed using a kit (Bioclin®, Bio gene Zika
130 virus PCR- K-203-6). The following primers and probes were used: ZIKV-F, 5'-
131 CCGCTGCCCAACACAAG-3'; ZIKV-R, 5'-CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT-
132 3'; ZIKV-P, 5'FAM-AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA-BHQ1-3,
133 developed according to Lanciotti et al (2007) with modifications. The RT-PCR was
134 performed following the manufacturer's instructions as published before [11]. Also,
135 real-time RT-PCR for chikungunya and dengue were performed using probe sequences
136 described before [12].

137 ***Assessment of Hemolysis***

138 Before miRNA profiling, we checked plasma samples for hemolysis by measuring
139 absorbance at 350–650 nm by spectrophotometry (Nanodrop 2000 spectrophotometer,
140 Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). Samples were classified as
141 “hemolyzed” if the OD414 exceeded a value of 0.2 [13]. Previously hemolyzed samples
142 were not used in the study.

143 ***Extraction of total plasma RNA enriched in miRNAs***

144 Total RNA was extracted from serum using the Qiagen miRNeasy® Mini Kit.
145 Serum/plasma was thawed on ice and centrifuged at 3000 x g for 5 min in a 4°C
146 microcentrifuge. An aliquot of 200 µL of serum/plasma per sample was transferred to a
147 new microcentrifuge tube and 750 µl of a Qiazol mixture containing 3 µL of a spike-in,
148 a synthetic miRNA from *Caenorhabditis elegans* (cel-miR-39) at 1.6×10^8 copies/µL
149 was added to each plasma sample (used as normalization in individual assay analyses).
150 The tube was mixed and incubated for 5 min followed by the addition of 200 µL
151 chloroform. The tube was mixed, incubated for 2 min and centrifuged at 12,000 x g for
152 15 min in a 4°C microcentrifuge. The upper aqueous phase was transferred to a new
153 microcentrifuge tube and 1.5 volume of 100% ethanol was added. The contents were
154 mixed thoroughly and 750 µL of the sample was transferred to a Qiagen RNeasy® Mini
155 spin column in a collection tube followed by centrifugation at 15,000 x g for 30 sec at
156 room temperature. The process was repeated until all remaining sample had been
157 loaded. The Qiagen RNeasy® Mini spin column was rinsed with 700 µL Qiagen RWT
158 buffer and centrifuged at 15,000 x g for 1 min at room temperature followed by another
159 rinse with 500 µL Qiagen RPE buffer and centrifuged at 15,000 x g for 1 min at room
160 temperature. A rinse step (500 µL Qiagen RPE buffer) was repeated 2X. The Qiagen
161 RNeasy® Mini spin column was transferred to a new collection tube and centrifuged at
162 15,000 x g for 2 min at room temperature. The Qiagen RNeasy® Mini spin column was
163 transferred to a new microcentrifuge tube and the lid was left uncapped for 1 min to
164 allow the column to dry. Total RNA was eluted by adding 14 µL of RNase-free water to
165 the membrane of the Qiagen RNeasy® mini spin column and incubating for 1 min
166 before centrifugation at 15,000 x g for 1 min at room temperature. The concentration of
167 the final material was determined by measuring the A260/A280 ratio using a NanoDrop

168 ND-2000 apparatus (Thermo Scientific, Waltham, Massachusetts, USA). The RNA was
169 stored in a -80°C freezer.

170 *MiRNA expression profiling*

171 Expression profiling of 377 miRNAs was carried out following the manufactures
172 protocol (ThermoFisher). Briefly, a multiplexed RT reaction was performed followed by
173 a pre-amplification using 2.5 µL of the transcript product and 22.5 µL of the pre-
174 amplification master mix with cycling conditions that included 10 min at 95°C, 2 min at
175 55°C, and 2 min at 72°C, 12 cycles of 15 s at 95°C and 4 min at 60°C, and 10 min at
176 99.9°C. Quantitative real-time RT-PCR was done utilizing pre-printed TLDA
177 microfluidic cards (Human Card A v3, format 384). The sample/master containing the
178 Megaplex pool was loaded into the cards, centrifuged and mechanically sealed with the
179 Applied Biosystems sealer device. Real time-PCR reaction was carried out on a
180 QuantStudio™ 12K Flex (Applied Biosystems) real time machine, using the cycling
181 conditions recommended by the manufacturer.

182 *miRNA statistical and unsupervised analyses*

183 To analyze the miRNA expression levels we uploaded the Real time generated raw data
184 files (file extension .EDS) in a ThermoFisher Cloud software v1.0 (Connect,
185 <https://www.thermofisher.com/br/en/home/cloud.html>). This software exploits an
186 independent samples t-test to compare Ct data to one randomly selected representative
187 reference control sample using a two-tailed p-value value of 0.05 and relative miRNA
188 expression levels are presented as fold change. The data files were first pre-processed
189 by using automatic baseline corrections and manually checked for each assay if
190 threshold cycle (Ct) value corresponded to midpoint of logarithmic amplification curve.
191 MiRNAs with a mean Ct >38 and detected in <80% of all samples were considered

192 below the detection level and excluded from further analysis, respectively. The
193 comparative threshold cycle method was used to calculate the relative miRNA
194 expression levels after global mean normalization (ΔCt) [14]. The samples unsupervised
195 analysis was performed by hierarchical clustering using Manhattan distance and average
196 linkage for columns and correlation distance and average linkage for rows and,
197 represented as a heatmap with ΔCt values for 113 miRNAs (rows) and 18 columns
198 (samples). The principal component analysis (PCA) of miRNA expression was
199 performed for all samples and the same set of miRNAs used in the hierarchical
200 clustering. PCA was performed by using a median centering of the data set. The x-axis
201 corresponds to principal component 1 (PC1) and y-axis to the principal component 2
202 (PC2) and the percentages of variance in both. Both hierarchical clustering and PCA
203 were built using ClustVis web tool. The miRNAs were considered differentially
204 expressed if $P \leq 0.05$ and absolute fold change $FC \geq 1.4$.

205 ***Analysis of miR-142-3p expression by real-time reverse transcriptase (RT)-PCR***

206 After total RNA isolation, using the miRNeasy Serum/Plasma kit (Qiagen), CDNA was
207 synthesized by reverse transcription using a fixed volume of RNA (2 μ L) and the
208 TaqMan microRNA Reverse Transcription kit (Life Technologies), according to the
209 manufacturer's instructions. The circulating levels of miR-142-3p and of synthetic RNA
210 (cel-miR-39) for spike-in (added during RNA extraction) were measured by RT-qPCR
211 using 1.33 μ L of the cDNA and miRNA-specific stem-loop primers provided by
212 TaqMan microRNA Assays kit (Life Technologies). Quantitative PCR reactions were
213 performed in triplicate on a QuantiStudio 12K Flex (Life Technologies), according to
214 the following program: 10 minutes at 95°C, 40 cycles of 15 seconds at 95°C and 60
215 seconds at 60°C. Values were normalized to cel-miR-39 spike in and analyzed by the
216 comparative method of Ct ($2^{-\Delta\Delta Ct}$). A threshold cycle (Ct) was observed in the

217 exponential phase of amplification, and quantification of relative expression levels was
218 performed using standard curves for miR-142-3p and cel-miR-39. Reactions were
219 performed in triplicate and Ct values were averaged for the replicates. The expression
220 was calculated as the mean \pm s.d. for each group as individual data points and the
221 following formula was used: Relative expression (fold change over Healthy group
222 samples) = $2^{-(\Delta CtA - \Delta CtB)}$, where Ct is the cycle threshold as previously described
223 [15]. The same was calculated for the healthy (control group), subtracting its mean by
224 each individual data point, so we could plot small variations close to 1 of fold change.
225 Groups were compared by a non-parametrical Kruskal Wallis test. The miRNAs were
226 considered differentially expressed if $P \leq 0.05$ and absolute fold change $FC \geq 1.5$.

227 ***Target prediction, canonical pathways enrichment, function and network analyses***

228 The software Ingenuity Pathways Analysis (IPA) (Qiagen, USA) was used in all
229 computational analyses. The Target prediction was performed using an IPA tool called
230 “target filter” which relies on four different database algorithms: TargetScan, TarBase,
231 miRecords and Ingenuity Expert Findings. In our target prediction analysis, we only
232 considered the DEMs targets that were experimentally validated and high predicted as
233 targets, based on the content of date 2019–12. The canonical pathway enrichment,
234 function and network analyses were performed by uploading these target lists identified
235 for each group on IPA software. The significance of the association between each list
236 and the canonical pathway and the relationship between two node molecules in the built
237 networks was measured by Fisher’s exact test. As a result, Benjamini-Hochberg
238 adjusted p-values (≤ 0.05) were obtained, determining the probability that the association
239 between the targets in our data set and the canonical pathways identified and networks
240 generated can be explained by chance alone.

241 *Bioinformatic and Statistical analysis*

242 MicroRNA profiling statistical analysis was carried out the Thermo Fisher Cloud
243 software (Connect) which exploits an independent samples t-test to compare $\Delta\Delta\text{Ct}$ data
244 to one randomly selected representative reference control sample using a two-tailed p-
245 value threshold of 0.05 with adjustment for false discovery rate with the Benjamini-
246 Hochberg. The comparative threshold cycle method was used to calculate the relative
247 miRNA expression after global normalization. Statistical significance threshold was
248 defined as $p \leq 0.05$ and fold change (FC) ≥ 1.5 . Unsupervised hierarchical clustering was
249 performed using squared Euclidean as distance measure and Ward's method for linkage
250 analysis and Z score normalization. The principal component analysis (PCA) plot of
251 samples was performed using all probe sets, by using a median centering of the data set.

252 **Results**

253 *Unsupervised analyses and identification of differentially expressed miRNAs (DEMs)* 254 *in plasma of patients infected with ZIKV*

255 We performed profiling of 377 miRNAs from plasma of Zika infected patients
256 at acute (ZIKV+) and recovery phase (RECZIKV+) of the disease compared to healthy
257 individuals (Healthy) from the same endemic area. **Figure 1A** summarizes experiment's
258 workflow showing the steps from blood collection to computational analyses. Briefly,
259 we performed miRNA expression profiling and identified the list of differentially
260 expressed miRNAs (DEMs) using a cloud-based software, as described in detail in
261 material and methods section. The miRNA profiles from each comparison were used to
262 find their predicted targets. The lists of predicted targets were used in functional,
263 upstream regulator and network analyses. The samples unsupervised analysis (PCA and
264 hierarchical clustering) based on the expression of 113 miRNAs with the higher

265 expression variance (rows) from each one of the 18 samples (columns) was performed
266 (**Figure 1B**). The analyses showed that miRNA expression profiles were able to
267 segregate and to inter-group cluster apart two groups: ZIKV+(yellow dots) and Healthy
268 (green dots), while the RECZIKV+ group (magenta dots) did not segregate from the
269 other two, with one sample clustering with the samples from the Healthy group and two
270 with the samples from the ZIKV+ group. Both PCA and hierarchical clustering
271 indicated that miRNA expression profiles were specific only to ZIKV+ and Healthy
272 groups with RECZIV+ group sharing miRnome profile similarities with these other two
273 groups.

274 *Identification of DEMS and DEMs putative targets prediction*

275 Analysis of differentially expressed genes revealed the highest number of DEMs in the
276 ZIKV+ compared to healthy group (**Figures 2A to C**). The Volcano plot representations
277 show 24 DEMs for ZIKV+ versus healthy with most miRNAs (22) downregulated with
278 only 2 upregulated (**Figure 2A**). The comparison between RECZIKV+ and Healthy
279 showed 8 DEMs with 2 up and 6 downregulated (**Figure 2B**). The **Supplementary Tables**
280 **2 and 3** depict the list of all DEMs at each comparison. **Figure 2C** shows a Venn
281 diagram with the number of DEMs from each group, ZIKV+ and RECZIKV+ compared
282 to healthy, and the 6 DEMs shared between the two groups (**Supplementary Table 4**). All
283 shared miRNAs are with their expression downregulated in both groups. Next, we used
284 a miRNA target prediction tool from Ingenuity Pathway Analysis software (IPA) to
285 screen putative targets of each list of DEMs. The target prediction analysis finds targets
286 (RNAs) that have in their 3'UTR, complementary sequences to the miRNA seed
287 sequence (nucleotides 2-8 from the 5' end of the mature sequence). As miRNAs with
288 the same seed sequence usually target the same RNAs, IPA software clusters together
289 the mature miRNAs that share the same 7-nucleotide seed sequence into one entity or

290 “node” in order to increase the specificity of targeting information. Three pairs out of
291 the 24 DEMs from the ZIKV+ group share the same seed sequence: let-7a-5p and let-
292 7e-5p (with seed GAGGUAG), miR-146a-5p and miR-146b-5p (with seed
293 GAGAACU) and miR-30b and miR-30c-5p (with seed GUAAACA). The set of miR-
294 30b and miR-30c-5p also are DEMs from the RECZIKV+. The target prediction
295 analysis also considers as targets only those that have been highly predicted as targets
296 (from TargetScan database) and/or experimentally validated as targets (from miRecords,
297 TarBase, and direct acquisition from the literature by Ingenuity knowledge Base -IKB).
298 From the list of 24 DEMs identified on ZIKV+ we found targeting information of 21 of
299 them. We thus obtained a list of 2754 targets (Supplementary Table 5) of the 21 DEMs
300 in ZIKV+. For the RECZIKV+, from the list of 8 DEMs after filtering we obtained a list
301 of 7 DEMs targeting a total number of 852 targets (Supplementary Table 6). Figure 2D
302 shows in a Venn diagram that ZIKV+ and RECZIKV have in common 692 targets
303 (Supplementary Table 7) of their DEMs.

304 ***Target set enrichment analysis reveals potential pathways regulated by miRNAs***
305 ***during acute and recovery phase of Zika infection.***

306 To predict the canonical pathways enriched as well potentially regulated by the
307 DEMs from each group we carried a functional analysis using IPA software. On **Figure**
308 **3** we show the top 10 most enriched canonical pathways (Benjamini-Hochberg adjusted
309 p-values ≤ 0.05) for specific list of targets from each group (ZIKV+ in blue, RECZIV+
310 in yellow and the shared targets in green). The stacked bar charts show the percentage
311 of target in each one of the enriched pathways for each group and the number in the top
312 of each bar represents the number of molecules in that given pathway. The analysis of
313 the 692 shared targets between ZIKV+ and RECZIKV+ (in green), showed an
314 overrepresentation of canonical pathways related to immune response, like pattern

315 recognition of pathogens by the innate immune response, Toll-like receptor signaling,
316 role of PRRs in recognition of viruses. Also, there is an enrichment of pathways related
317 to inflammation, e.g. IL-6, IL-10 signaling and most importantly neuroinflammation.
318 Furthermore, for the ZIKV+ exclusive targets (in blue) we found pathways related to
319 response to cell stress like apoptosis and Senescence pathways and for the RECZIKV+
320 (yellow) we found canonical pathways like oncostatin M, autophagy and interferon
321 signaling among others.

322 ***DEMs/targets networks revealed key molecules during ZIKV+ infection.***

323 In order to investigate the possible role of miRNAs in regulating key targets
324 during acute and recovery phase of Zika infection, we built DEM-target networks for
325 both groups (ZIKV+ and RECZIKV+). IPA has a graphical database of networks of
326 interacting molecules (Ingenuity Knowledge Base, IKB). Molecules (genes, proteins)
327 are represented as nodes and biological relationships between nodes are represented as
328 edges (lines). All connections are supported by at least one reference from the literature
329 or canonical information stored in the IKB. The built networks and prediction analysis
330 revealed the potential role/connection of DEMs and their targets in regulating the top
331 predicted canonical pathways in each group: Senescence pathway in the ZIKV+ group
332 (**Figure 4**) and Oncostatin M signaling in RECZIKV+ group (**Figure 5**). The molecules
333 are represented in graduation of red or green based on their fold change (up and
334 downregulated, respectively) and orange or blue (predicted to be activated or inhibited).
335 Each node shape represents one type of molecule. The combined biological interaction
336 in both built networks revealed genes that are central nodes connected to multiple other
337 molecules. The ZIKV+ network showed some molecules as central nodes: e.g.
338 interferon alpha, CXCL10, Interferon gamma (IFNG), interferon regulatory factor 1
339 (IRF1), miR-125a-5p and its experimentally validated target ELAV like RNA binding

340 protein 1 (ELAV1). For the RECZIKV+ network miR-30a-5p is a central node
341 targeting some other node molecules like signal transducer and activator of transcription
342 1 (STAT1) and 3 (STAT3), activator protein 1 (JUN), and neuronal differentiation 1
343 (NEUROD1). Molecules directly or indirectly related to oncostatin M signaling.

344 *The haematopoietic-cell-specific miRNA miR-142-3p downregulated during acute*
345 *Zika infection potentially regulates viral entry endocytic pathways*

346 We further investigate the potential role of miR-142-3p a miRNA expressed
347 specifically in haematopoietic cells. This miRNA is downregulated in plasma of ZIKV+
348 patients. We first performed qPCR validation of miR-142-3p in a bigger cohort, as
349 shown in **Figure 6A** confirming its significant downregulation in ZIKV+ infected
350 patients compared to Healthy individuals and RECZIKV+ patients. The expression was
351 calculated as the mean \pm s.d. for each group as individual data points using the relative
352 expression (fold change over Healthy) by the $2^{-\Delta\Delta Ct}$ method and groups were compared
353 by a non-parametrical Kruskal Wallis test. **Figure 6B** shows that among the enriched
354 canonical pathways identified for miR-142-3p targets are pathways related to
355 endocytosis mechanisms: Clathrin-mediated Endocytosis signaling and Virus entry via
356 Endocytic pathways indicating that this microRNA can potentially regulate targets
357 related to intracellular trafficking and ZIKV+ entry pathways. **Figure 7** shows the
358 molecules are experimentally validated targets of miR-142-3p within the Virus entry via
359 endocytic pathway: Clathrin, Rac family small GTPase 1 (RAC1), Integrin β , CXADR
360 Ig-like cell adhesion molecule (CAR) and Protein kinase C (PKC). The prediction
361 analysis showed that the downregulation of miR-142-3p induced by ZIKV infection will
362 interfere with the endocytic network activating process related to the virus intracellular
363 trafficking incoming mechanism (in orange).

364 **DISCUSSION**

365 MiRNAs are crucial post transcriptional regulators which promote target
366 messenger RNA decay or translational inhibition. In the past years different studies
367 have shown their biological importance during health and disease. It also known that
368 these small RNAs can be actively or passively present in different biofluids, including
369 serum and plasma due cell secretion or upon tissue damage, respectively. They can act
370 as hormones mediating tissue crosstalk during physiological and pathogenic conditions
371 and the study of circulating miRNAs profiles can potentially reveal new biological
372 mechanisms as well as disease biomarkers. Although miRNAs have been studied during
373 Zika *in vitro* and *in vivo* infection, to best of our knowledge, there is no study providing
374 miRNA circulating profiling during Zika infection. In this study, we compared plasma
375 miRNA profiles from Zika infected patients during acute (ZIKV+) and recovery phase
376 of infection (RECZIKV+) compared to the one of healthy individuals. Our results
377 demonstrated that Zika infected patients have a differential plasma miRNA expression
378 profile compared to healthy individuals, characterized as a major downregulation of
379 most of the miRNAs analyzed. Some recent studies have also shown a global miRNA
380 downregulation in ZIKV-infected neurons *in vitro*, with few upregulated [16]. Here, we
381 found that ZIKV+ patients showed 22 downregulated and only two miRNAs
382 upregulated (miR-340 and miR-365-3p) in their plasma. Dysregulation in miRNA
383 expression has been previously shown to play critical roles during viral infections,
384 controlling virus replication and modulating anti-viral immunity [17; 18]. ZIKV *in vitro*
385 infection of human astrocytes was able to downregulate a great number of miRNAs
386 including from the miR-30 family and miR-17-5p leading to deregulation of biological
387 processes related to unfolded protein response pathway and interferon (IFN)- β
388 production [19]. MiR-340-5p, was previously described downregulated *in vitro*

389 infection with influenza A virus and mediates a regulatory feedback loop during host-
390 virus interactions to control both antiviral responses and infection [20]. MiR-365-3p can
391 negative regulate interleukin 6 (IL-6) gene expression [21], a central cytokine during
392 acute phase response and associated in central nervous system protection during viral
393 infections [22]. MiR-146 downregulated in the comparison between ZIKV+ and
394 RECZIKV+ with Healthy group has an important role in IFN signaling. Wangs et al.
395 have shown that miR-146 was able to suppress STAT1 dependent expression of type 1
396 and 2 interferons during HBV proliferation [23]. Another important miRNA, miR-199
397 is downregulated in ZIKV+ group, a miRNA described as key during HCV replication
398 as its upregulation is related to increased viral replication [24; 25]. Here we observed by
399 the clustering analysis of miRNA profiling that when the patients pass from the acute to
400 convalescent phase, their plasma miRNA expression profiles are similar to the ones of
401 the healthy group, despite still having dysregulated miRNAs in common with the
402 ZIKV+ group. Computational analysis revealed that senescence signaling is a potential
403 canonical pathway modulated by the dysregulated miRNAs observed in ZIKV+
404 patients. Cellular senescence is described as a signaling pathway with dual opposite
405 roles during cellular stress like viral infections. It can induce a proinflammatory
406 phenotype and cell host protection [26] but also can be used by the pathogen, like
407 viruses, as a strategy to escape from cellular antiviral system. The built network with
408 targets of DEMs from ZIKV+ group showed as a central node the Embryonic Lethal
409 Abnormal Vision (ELAVL1), an RNA binding protein (RBP) that is responsible for the
410 stabilization mRNAs of different types of genes, including the ones related to apoptosis
411 and rapid inflammatory and stress response. ELAVL1 also named HUR was previously
412 shown to be an experimentally validated target of miR-125b-5p [27; 28] a miRNA that
413 we observed to be downregulated in plasma of ZIKV+ patients. The importance of this

414 RNA binding protein and miRNA-125 was previously highlighted during in vitro HCV
415 infection, where it was observed that cells transfected with antagomirs for mir-125,
416 causing its downregulation had an increased ELAVL1 protein abundance in the cell
417 cytoplasm what is correlated to an increase in HCV replication. This may be related to
418 another described function of ELAV1 as an IFN- α abundance regulator. ELAVL1
419 strongly interacts with IFN- α that like most of cytokines contain adenylate-uridylate
420 (A/U)-rich elements (ARES), that make them highly unstable. Based on that, reduced
421 expression of ELAVL1 downregulated type 1 IFN secretion and the first response to
422 viruses [29]. For the RECZIKV+, miR-125 doesn't appears in the list of significantly
423 dysregulated miRNAs, and Interferon signaling is among the enriched canonical
424 pathways for this group. The top 2 most enriched pathways for RECZIKV+ are
425 Oncostatin M signaling and Role of JAK family kinases in IL-6-type cytokine signaling,
426 both cytokines are members of the same cytokine family who share related receptor
427 complexes and mediate communication between the central nervous system and the
428 immune system. Among the targets identified for miR-30a-5p which is downregulated
429 in both groups (ZIKV+ and RECZIKV+) compared to Healthy is JAK1 within the
430 Oncostatin signaling pathway. In response to viral infections, the JAK/STAT signaling
431 pathway is essential in the regulation of local inflammation [30]. Oncostatin was
432 described to play important roles during physiological and pathological conditions by
433 maintaining neural precursor cells homeostasis and having neuroprotective action,
434 respectively [31]. Among the enriched canonical pathways enriched in the list of shared
435 DEMs targets are the ones related to immune response, and inflammation. e.g.
436 Neuroinflammation, Toll-like receptor, Role of PRRs in recognition of viruses and IL-6
437 signaling. Finally, we highlighted the importance and previously described functions of
438 miR-142-3p in the context of viral infections. This microRNA was first described by

439 Chen et al. in 2004 as specifically expressed in embryonic and adult hematopoietic
440 tissues and is required for hematopoietic lineages development and function [32]. MiR-
441 142-3p was also shown targeting cytokines like IL-6 and ITGAV. Importantly, this
442 miRNA interferes in viral replication, as previously showed in ZIKV-infected human
443 umbilical cord mesenchymal stem cells assays [33]. Besides confer an anti-viral defense
444 as report by Berrien-Elliott et al 2019 for maintaining homeostasis and function of type
445 I innate lymphoid cells [34]. Enrichment analysis showed potential canonical pathways
446 regulated by miR-142-3p, among them we observed pathways related to endocytosis
447 mechanisms: e.g. Clathrin-mediated Endocytosis signaling and Virus entry via
448 Endocytic pathways indicating that this microRNA can potentially regulate targets
449 related to intracellular trafficking and virus entry pathways. Among the high predicted
450 and experimentally validated targets of miR-142-3p are: Clathrin, Rac family small
451 GTPase 1 (RAC1), Integrin b, CXADR Ig-like cell adhesion molecule (CAR) and
452 Protein kinase C (PKC). The prediction analysis showed that the downregulation of
453 miR-142-3p induced by viral infection will interfere with the endocytic network
454 activating process related to the virus intracellular trafficking incoming mechanism. Our
455 results showed a major downregulation of miRNAs in plasma infected with ZIKV,
456 importantly we further validated miR-142-3p downregulation in a bigger cohort. By
457 identifying the targets of the DEMs we listed important pathways potentially regulated
458 by the dysregulated miRNAs and by building DEMs-targets networks we could identify
459 specific central molecules for acute and recovery phase of ZIKV infection. We think
460 that further study of these molecules may translate in the identification of novel
461 therapeutic targets and biomarkers of infection recovery.

FIGURE LEGENDS

Figure 1A-B - Workflow and unsupervised analysis of miRNAs. (A) Sample collection, distribution of the studied groups, data processing and analysis of miRNA expression profiles in Zika acutely infected patients (ZIKV+; yellow dots) and at the recovery phase of infection (RECZIKV+; magenta dots) compared to Healthy individuals (Healthy; green dots) corresponds to the group of people not infected with the zika virus.(B) Principal component analysis (PCA) of miRNA based on all samples and 113 differentially expressed miRNA (DEMs) by using a median centering of the data set. Heatmap and hierarchical clustering was performed with on all the samples using Manhattan distance and average linkage for columns and correlation distance and average linkage for rows and, represented as a heatmap with Δ Ct values for 113 miRNAs (rows) and 18 columns (samples). The color scale illustrates the fold change in microRNAs expression relative to all groups; red and blue represents upregulation and downregulation respectively.

Figure 2 A to D - Profiling of differentially expressed miRNA in ZIKV+, RECZIKV+, healthy individuals and their targets numbers. (A-B) Volcano plot of altered microRNAs from the samples of ZIKV+ versus Healthy group and RECZIKV+ versus healthy group. The color scale illustrates the log₂ fold change in microRNAs expression relative to all groups; red and blue represents upregulation and downregulation respectively. (C) Venn diagram demonstrated the number of DEMs from each group and six miRNAs are common between the ZIKV+ and RECZIKV+, all of them are downregulation. (D) Venn diagram of the putative RNAs targets predicted for up- and downregulated miRNAs in ZIKV+ and RECZIKV+.

Figure 3 - Ingenuity Pathway Analysis (IPA) canonical pathways most significantly enriched in the ZIKV+ (blue color); RECZIKV+ (yellow color); Both groups (green color). The stacked bar chart displays the percentage of target DEMs molecules present in each pathway. The numerical value in the right in front each pathway name represents the total number of molecules in that canonical pathway. The Benjamini-Hochberg method was used to adjust the right-tailed Fisher's exact test P-value, which was always (≤ 0.05).

Figure 4 - DEMs and molecules networks related to Senescence pathway regulation in ZIKV+. Network were built using IPA software. Each molecule was represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). All edges are supported by at least one reference from the literature or from canonical information stored in the Ingenuity Knowledge Base (IKB). The central nodes connected to multiple other molecules. The ZIKV+ network showed some molecules as central nodes: interferon alpha, CXCL10, Interferon gamma (IFNG), interferon regulatory factor 1 (IRF1), miR-125a-5p and its experimentally validated target ELAV like RNA binding protein 1 (ELAV1). The molecules are represented in graduation of orange and blue based on the state prediction, activated or inhibited, respectively.

Figure 5 - DEMs and molecules networks related to Oncostatin M pathway regulation in RECZIKV+. Network were built using IPA software. Each molecule was represented as nodes, and the biological relationship between two nodes is represented as an edge (line). All edges are supported by at least one reference from the literature or from canonical information stored in the Ingenuity Knowledge Base (IKB). The molecules network is directly or indirectly related to the oncostatin M signaling canonical pathway. MiR-30a-5p is a central node targeting

some other node molecules like signal transducer and activator of transcription 1 (STAT1) and 3 (STAT3), activator protein 1 (JUN), and neuronal differentiation 1 (NEUROD1).

Figure 6 AB - Evaluation of miR-142-3p in the ZIKV +, RECZIKV + and Healthy group. (A) The qPCR validation in a bigger cohort was performed with ZIKV+ patients (n=22) and Healthy individuals (n=16) and the same 6 previously analyzed 6 RECZIKV+ patients. MiR-142-3p is significantly downregulated in ZIKV+ compared to Healthy individuals (* $p \leq 0.05$) and RECZIKV+ (** $p \leq 0.005$). The expression was calculated as the mean \pm s.d. for each group as individual data points using the relative expression (fold change over Healthy) by the $2^{-\Delta\Delta ct}$ method and groups were compared by a non-parametrical Kruskal Wallis test. (B) Enriched canonical pathways identified for miR-142-3p targets using IPA software.

Figure 7 – Targets potentially regulated by MiR-142-3p within the Virus Entry via Endocytic canonical pathway. Molecules high predicted and experimentally validated as targets of miR-142-3p within the Virus entry via endocytic pathway are shown as nodes with each node shape representing one type of molecule as indicated in the figure: Clathrin, Rac family small GTPase 1 (RAC1), Integrin b, CXADR Ig-like cell adhesion molecule (CAR) and Protein kinase C (PKC). Molecules and functions are colored based on their predicted activation state: activated (orange) or inhibited (blue) or when available in graduation of green or red based on their fold change in expression, downregulated or upregulated, respectively.

Table 1- Characteristics of individuals/patients from the miRNA profiling cohort.

Patient Code	Group	Sex	Age (years)	Days (Symptom onset to sampling)	qPCR ZIKV (C.T.)**
H1	Healthy	F	34	None	N.A
H2	Healthy	F	36	None	N.A
H3	Healthy	F	39	None	N.A
H4	Healthy	F	36	None	N.A
H5	Healthy	F	53	None	N.A
H6	Healthy	F	37	None	N.A
ZIKV+1	ZIKV+	F	36	4	38.92
ZIKV+2	ZIKV+	F	34	3	31.25
ZIKV+3	ZIKV+	F	49	4	35.82
ZIKV+4	ZIKV+	F	36	2	35.85
ZIKV+5	ZIKV+	M	33	9	29.28
ZIKV+6	ZIKV+	M	28	2	27.21
ZIKV+7	ZIKV+	M	24	3	37.88
RECZIKV+1	ZIKV+	F	39	>15	N.A
RECZIKV+2	ZIKV+	F	36	>15	N.A
RECZIKV+3	ZIKV+	F	36	>15	N.A
RECZIKV+4	ZIKV+	F	34	>15	N.A
RECZIKV+5	ZIKV+	F	49	>15	N.A

Legend: Sex: F = female; M = male; C.T = cycle threshold; None = no symptoms; N.A = not amplified. Samples used for miRNA profiling: 6 healthy individuals (Healthy), 7 ZIKV+ and 5 RECZIKV+ patient samples. Blood samples were collected into EDTA-coated.

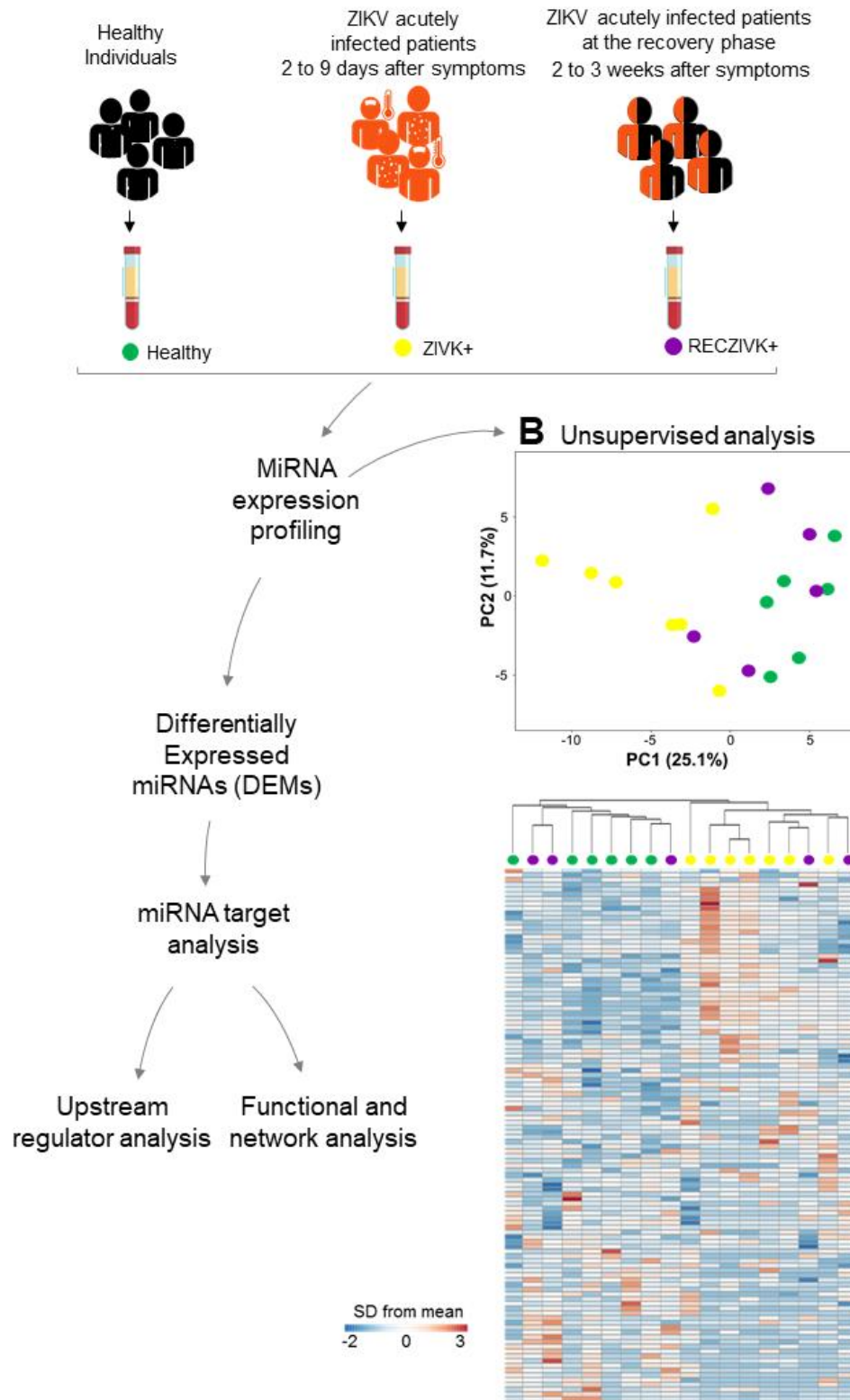


Figure 1A-B - Workflow and unsupervised analysis of miRNAs.

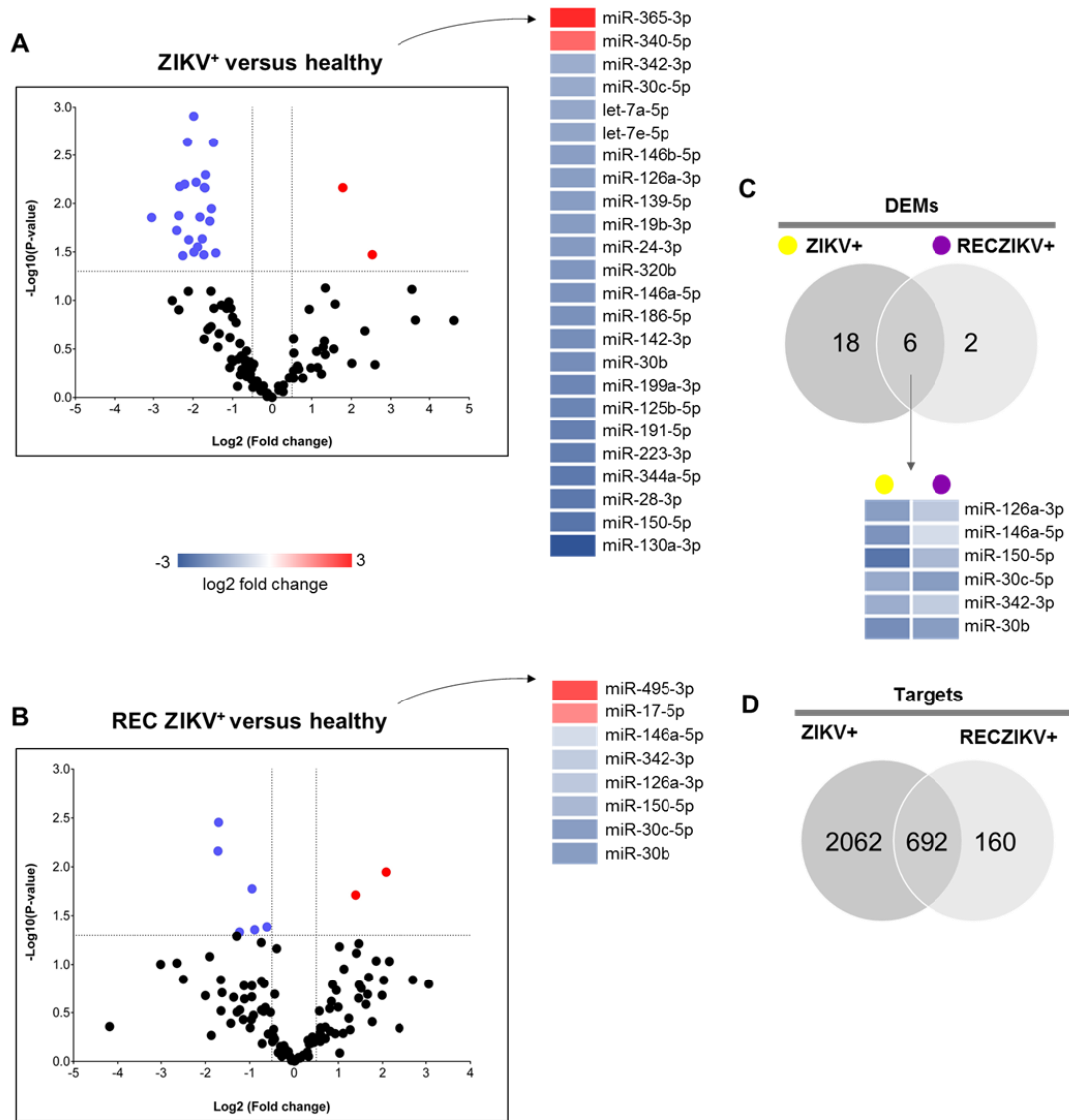


Figure 2 A to D - Profiling of differentially expressed miRNA in ZIKV⁺, RECZIKV⁺, healthy individuals and their targets numbers.

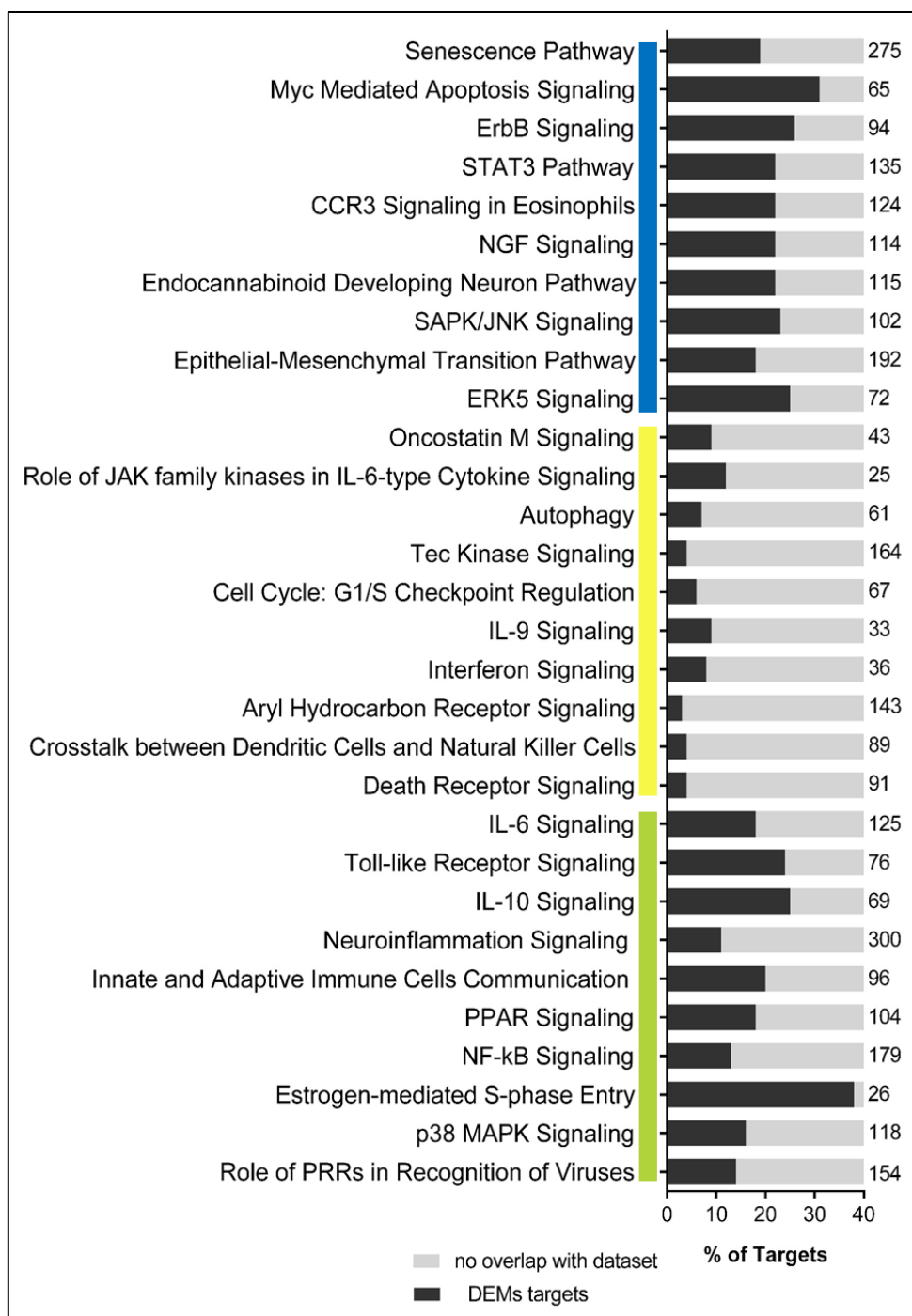


Figure 3 - Ingenuity Pathway Analysis (IPA) canonical pathways most significantly enriched in the ZIKV+ (blue color); RECZIKV+ (yellow color); Both groups (green color).

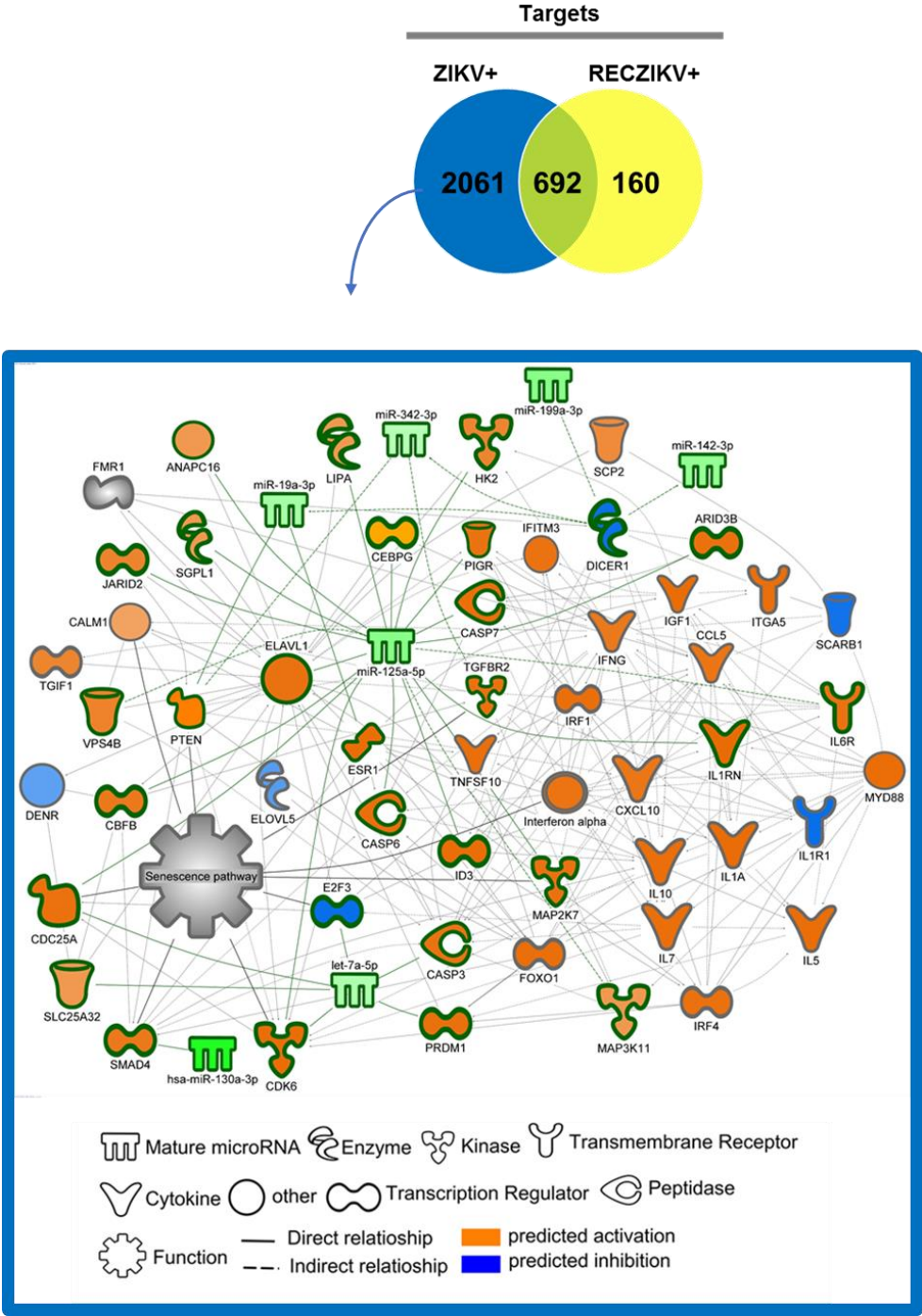


Figure 4 - DEMs and molecules networks related to Senescence pathway regulation in ZIKV+. Network were built using IPA software.

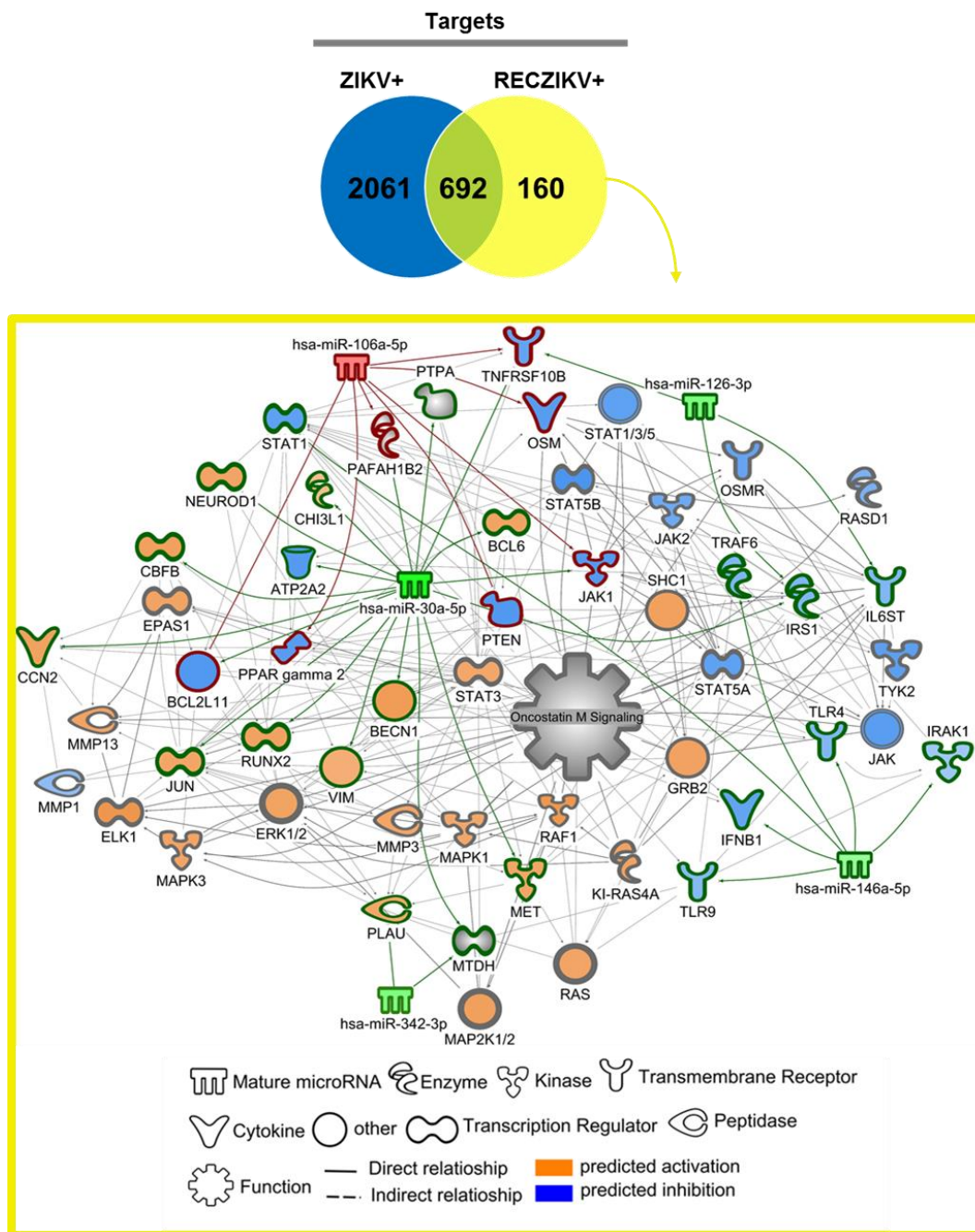


Figure 5 - DEMs and molecules networks related to Oncostatin M pathway regulation in RECZIKV+. Network were built using IPA software.

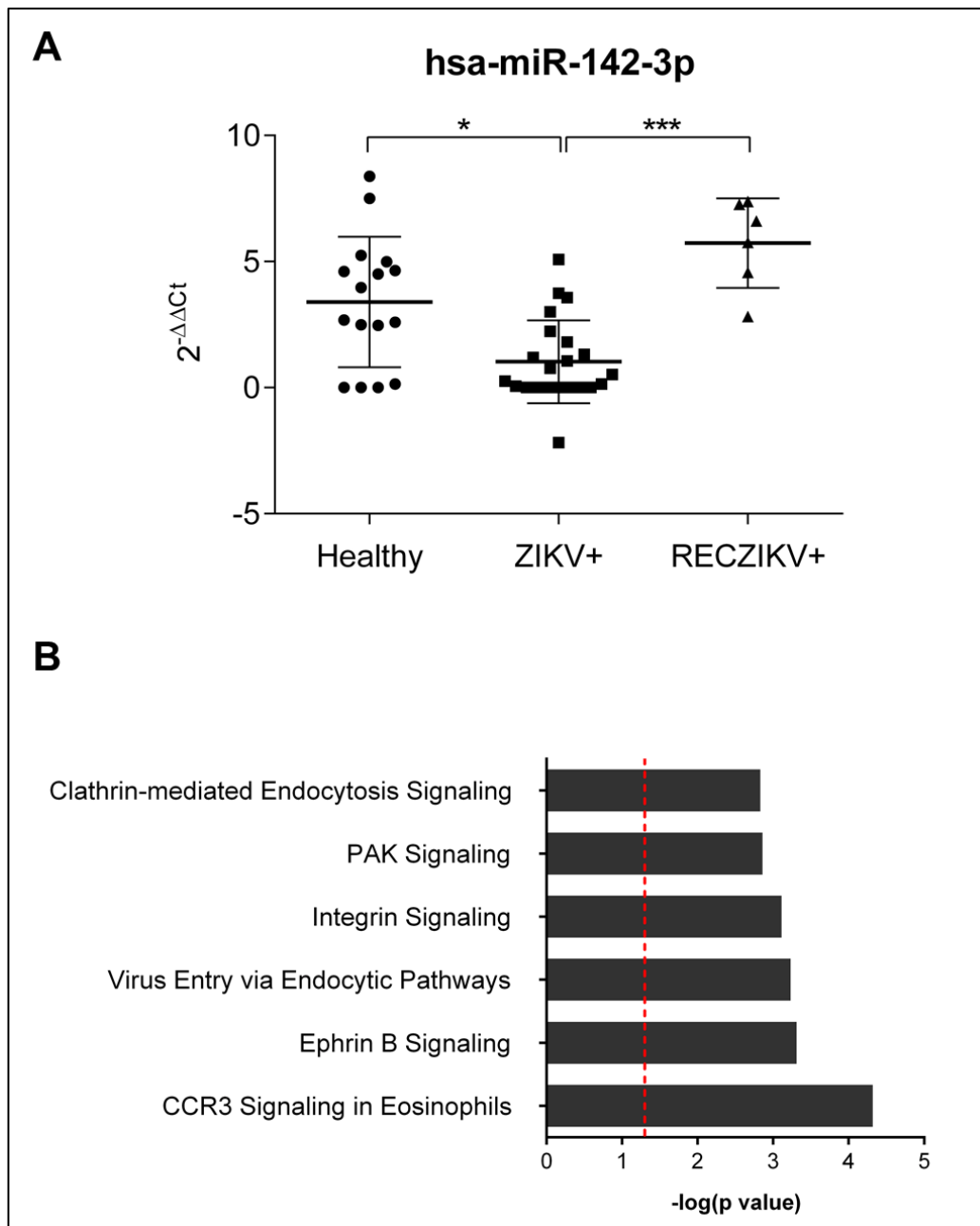


Figure 6 AB - Evaluation of miR-142-3p in the ZIKV +, RECZIKV + and Healthy group.

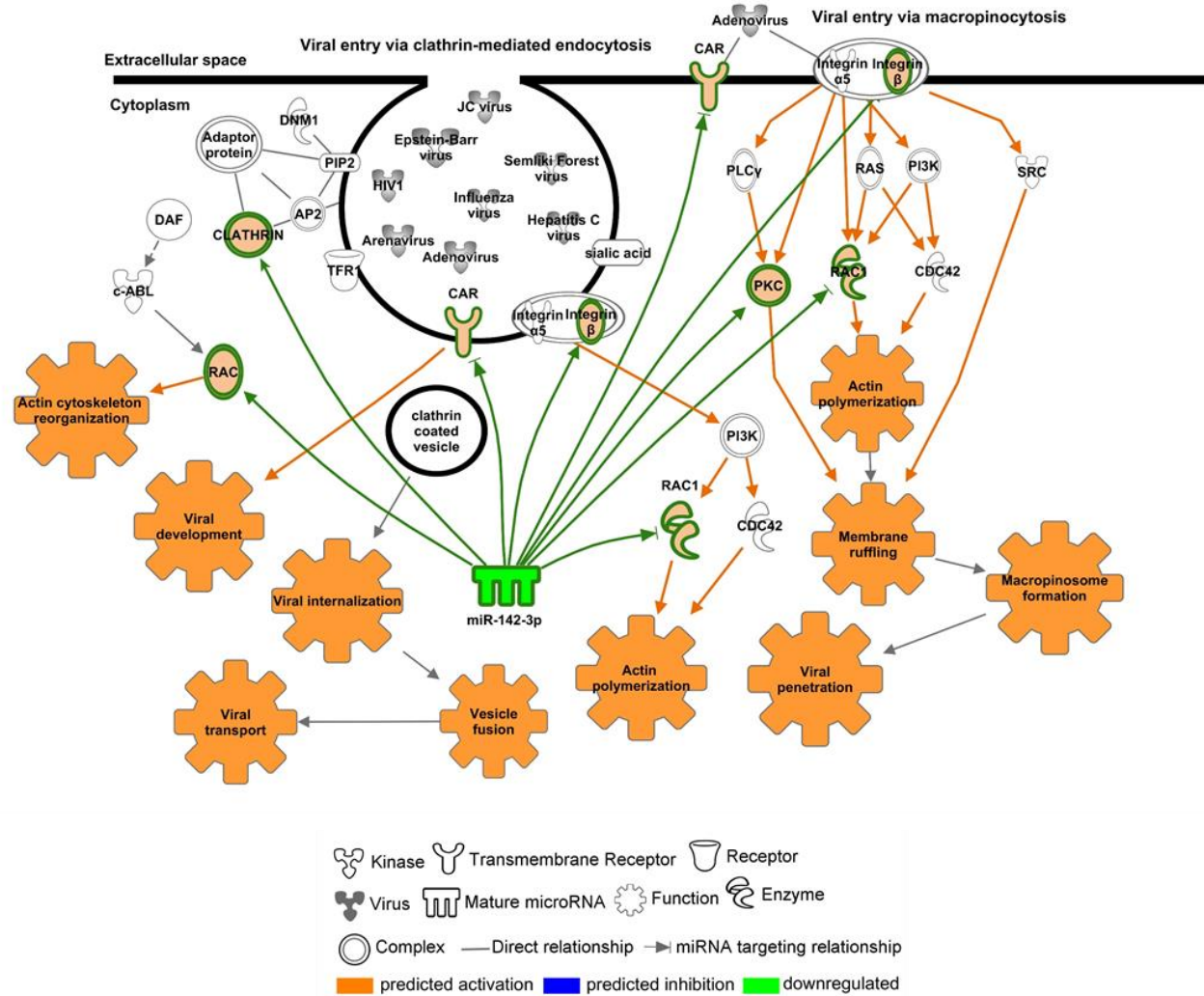


Figure 7 – Targets potentially regulated by MiR-142-3p within the Virus Entry via Endocytic canonical pathway.

SUPPLEMENTARY MATERIALS

Supplementary Table 1 - Clinical characteristics of the cohort study subject

SUJECT CODE	SEX	AGE (YEARS)	GROUP
H1 [#]	F	34	Healthy
H2 [#]	F	36	Healthy
H3 [#]	F	39	Healthy
H4 [#]	F	36	Healthy
H5 [#]	F	53	Healthy
H6 [#]	F	37	Healthy
H7 ^{&}	M	29	Healthy
H8 ^{&}	M	27	Healthy
H9 ^{&}	F	29	Healthy
H10	M	58	Healthy
H11 ^{&}	M	34	Healthy
H12	F	32	Healthy
H13 ^{&}	M	27	Healthy
H14 ^{&}	M	31	Healthy
H15 ^{&}	M	39	Healthy
H16	M	35	Healthy
H17 ^{&}	F	30	Healthy
H18 ^{&}	M	30	Healthy
H19 ^{&}	M	42	Healthy
H20 ^{&}	F	44	Healthy
H21 ^{&}	M	56	Healthy
H22 ^{&}	M	58	Healthy
H23 ^{&}	M	31	Healthy
H24 ^{&}	M	26	Healthy
H25 ^{&}	M	42	Healthy
RECZIKV+1 ^{#, &}	F	39	RECZIK+
RECZIKV+2 ^{#, &}	F	36	RECZIK+
ZIKV+1/RECZIKV+3 ^{#, &}	F	36	RECZIK+/ZIKV+
ZIKV+2/RECZIKV+4 ^{#, &}	F	34	RECZIK+/ZIKV+
ZIKV+3/RECZIKV+5 ^{#, &}	F	49	RECZIK+/ZIKV+
ZIKV+4 [#]	F	36	ZIKV+
ZIKV+5 [#]	M	33	ZIKV+
ZIKV+6 ^{#, &}	M	28	ZIKV+
ZIKV+7 [#]	M	24	ZIKV+
ZIKV+8 ^{&}	F	53	ZIKV+
ZIKV+9 ^{&}	F	23	ZIKV+
ZIKV+10 ^{&}	F	47	ZIKV+
ZIKV+11 ^{&}	F	25	ZIKV+
ZIKV+12 ^{&}	F	40	ZIKV+
ZIKV+13 ^{&}	M	61	ZIKV+
ZIKV+14 ^{&}	M	22	ZIKV+
ZIKV+15 ^{&}	F	56	ZIKV+
ZIKV+16 ^{&}	F	28	ZIKV+
ZIKV+17 ^{&}	F	41	ZIKV+
ZIKV+18 ^{&}	M	18	ZIKV+
ZIKV+19 ^{&}	M	10	ZIKV+
ZIKV+20 ^{&}	F	37	ZIKV+
ZIKV+21 ^{&}	F	62	ZIKV+
ZIKV+22 ^{&}	F	30	ZIKV+
ZIKV+23 ^{&}	F	34	ZIKV+
ZIKV+24 ^{&}	F	38	ZIKV+
ZIKV+25 ^{&}	F	37	ZIKV+

Legend: SEX: F = female; M = male CONT = Individuals in the control group; ZIKAV+ = Patients infected with Zika virus; REC-ZIKV+ = Zika-infected patients in convalescence phase. # Samples used for miRNA profiling. & samples used for miR-142-3p qPCR.

Supplementary Table 2 - List of DEMs in ZIKV+ vs Healthy

MicroRNA symbol/seed sequence	Mirbase ID	p value	fold change	log2 fold change
miR-365-3p (and other miRNAs w/seed AAUGCCC)	MIMAT0000710	0.034	5,77	2,53
miR-340-5p (miRNAs w/seed UAUAAAG)	MIMAT0004692	0.007	3,45	1,79
miR-342-3p (miRNAs w/seed CUCACAC)	MIMAT0000753	0.032	-2,69	-1,43
miR-30c-5p (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	MIMAT0000244	0.002	-2,79	-1,48
let-7a-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	MIMAT0000414	0.011	-2,90	-1,54
let-7e-5p (and other miRNAs w/seed GAGGUAG)	MIMAT0000066	0.015	-2,99	-1,58
miR-146b-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU)	MIMAT0002809	0.005	-3,22	-1,68
miR-126a-3p (and other miRNAs w/seed CGUACCG)	MIMAT0000445	0.007	-3,25	-1,70
miR-139-5p (miRNAs w/seed CUACAGU)	MIMAT0000656	0.007	-3,28	-1,71
miR-19b-3p (and other miRNAs w/seed GUGCAAA)	MIMAT0000074	0.034	-3,31	-1,73
miR-24-3p (and other miRNAs w/seed GGCUCAG)	MIMAT0000080	0.023	-3,40	-1,77
miR-320b (and other miRNAs w/seed AAAGCUG)	MIMAT0000510	0.014	-3,55	-1,83
miR-146a-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU)	MIMAT0000449	0.028	-3,69	-1,88
miR-186-5p (miRNAs w/seed AAAGAAU)	MIMAT0000456	0.006	-3,79	-1,92
miR-142-3p (and other miRNAs w/seed GUAGUGU)	MIMAT0000434	0.032	-3,94	-1,98
miR-30b (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	MIMAT0000420	0.001	-3,95	-1,98
miR-199a-3p (and other miRNAs w/seed CAGUAGU)	MIMAT0000232	0.024	-4,31	-2,11
miR-125b-5p (and other miRNAs w/seed CCCUGAG)	MIMAT0000443	0.002	-4,41	-2,14
miR-191-5p (and other miRNAs w/seed AACGGAA)	MIMAT0000440	0.006	-4,63	-2,21
miR-223-3p (miRNAs w/seed GUCAGUU)	MIMAT0000280	0.035	-4,79	-2,26
miR-344a-5p (and other miRNAs w/seed CAGGCUC)	MIMAT0002174	0.007	-5,05	-2,34
miR-28-3p (and other miRNAs w/seed ACUAGAU)	MIMAT0004502	0.013	-5,13	-2,36
miR-150-5p (and other miRNAs w/seed CUCCCAA)	MIMAT0000451	0.019	-5,32	-2,41
miR-130a-3p (and other miRNAs w/seed AGUGCAA)	MIMAT0000425	0.014	-8,26	-3,05

Supplementary Table 3 - List of DEMs in RECZIKV+ vs Healthy

MicroRNA Symbol/seed sequence	Mirbase ID	p value	fold change	log2foldchange
miR-495-3p (and other miRNAs w/seed AACAAAC)	MIMAT0002817	0,01100	4,23	2,08
miR-17-5p (and other miRNAs w/seed AAAGUGC)	MIMAT0000103	0,01900	2,62	1,39
miR-146a-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU)	MIMAT0002809	0,04100	-1,53	-0,61
miR-342-3p (miRNAs w/seed CUCACAC)	MIMAT0000753	0,04400	-1,85	-0,89
miR-126a-3p (and other miRNAs w/seed CGUACCG)	MIMAT0000445	0,01700	-1,93	-0,95
miR-150-5p (and other miRNAs w/seed CUCCCAA)	MIMAT0000451	0,04600	-2,35	-1,23
miR-30c-5p (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	MIMAT0000244	0,00400	-3,26	-1,70
miR-30b (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	MIMAT0000420	0,00700	-3,29	-1,72

Supplementary Table 4 - List of DEMs in common between ZIKV+ and RECZIKV+

MicroRNA Symbol/seed sequence	Mirbase ID	p value ZIKV+	p value RECZIKV+	fold change ZIKV+	fold change RECZIKV+	log2foldchange ZIKV+	log2foldchange RECZIKV+
miR-126a-3p (and other miRNAs w/seed CGUACCG)	MIMAT0000445	0,007	0,017	-3,25	-1,931	-1,70	-0,95
miR-146a-5p (and other miRNAs w/seed GAGAACU)	MIMAT0000449	0,028	0,041	-3,69	-1,529	-1,88	-0,61
miR-150-5p (and other miRNAs w/seed CUCCCAA)	MIMAT0000451	0,019	0,046	-5,32	-2,347	-2,41	-1,23
miR-30c-5p (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	MIMAT0000244	0,002	0,007	-2,79	-3,289	-1,48	-1,72
miR-342-3p (miRNAs w/seed CUCACAC)	MIMAT0000753	0,032	0,044	-2,69	-1,852	-1,43	-0,89
miR-30b (and other miRNAs w/seed GUAAACA)	MIMAT0000420	0,001	0,007	-3,95	-3,289	-1,98	-1,72

REFERENCES

- [1] R. Hamel, O. Dejarnac, S. Wichit, P. Ekchariyawat, A. Neyret, N. Luplertlop, M. Perera-Lecoin, P. Surasombatpattana, L. Talignani, F. Thomas, V.M. Cao-Lormeau, V. Choumet, L. Briant, P. Despres, A. Amara, H. Yssel, and D. Misse, Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* 89 (2015) 8880-96.
- [2] G.S. Campos, A.C. Bandeira, and S.I. Sardi, Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21 (2015) 1885-6.
- [3] C. Zanluca, V.C. Melo, A.L. Mosimann, G.I. Santos, C.N. Santos, and K. Luz, First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110 (2015) 569-72.
- [4] E. Oehler, L. Watrin, P. Larre, I. Leparç-Goffart, S. Lastere, F. Valour, L. Baudouin, H. Mallet, D. Musso, and F. Ghawche, Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* 19 (2014).
- [5] D. Musso, C. Roche, E. Robin, T. Nhan, A. Teissier, and V.M. Cao-Lormeau, Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 21 (2015) 359-61.
- [6] N.S. De Carvalho, B.F. De Carvalho, C.A. Fugaca, B. Doris, and E.S. Biscaia, Zika virus infection during pregnancy and microcephaly occurrence: a review of literature and Brazilian data. *Braz J Infect Dis* 20 (2016) 282-9.
- [7] E.R. Alvarez-Buylla, M. Benitez, E.B. Davila, A. Chaos, C. Espinosa-Soto, and P. Padilla-Longoria, Gene regulatory network models for plant development. *Curr Opin Plant Biol* 10 (2007) 83-91.
- [8] E. van Rooij, The art of microRNA research. *Circ Res* 108 (2011) 219-34.
- [9] P.S. Mitchell, R.K. Parkin, E.M. Kroh, B.R. Fritz, S.K. Wyman, E.L. Pogosova-Agadjanyan, A. Peterson, J. Noteboom, K.C. O'Brian, A. Allen, D.W. Lin, N. Urban, C.W. Drescher, B.S. Knudsen, D.L. Stirewalt, R. Gentleman, R.L. Vessella, P.S. Nelson, D.B. Martin, and M. Tewari, Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 105 (2008) 10513-8.
- [10] X. Ouyang, X. Jiang, D. Gu, Y. Zhang, S.K. Kong, C. Jiang, and W. Xie, Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. *Int J Med Sci* 13 (2016) 195-205.
- [11] R.S. Lanciotti, O.L. Kosoy, J.J. Laven, J.O. Velez, A.J. Lambert, A.J. Johnson, S.M. Stanfield, and M.R. Duffy, Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 14 (2008) 1232-9.

- [12] J.B.S. Barros, P.A.N. da Silva, R.C.R. Koga, P. Gonzalez-Dias, J.R. Carmo Filho, P.R.A. Nagib, V. Coelho, H.I. Nakaya, S.G. Fonseca, and I.A.H. Pfrimer, Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations. *Front Immunol* 9 (2018) 821.
- [13] M.B. Kirschner, S.C. Kao, J.J. Edelman, N.J. Armstrong, M.P. Valley, N. van Zandwijk, and G. Reid, Haemolysis during sample preparation alters microRNA content of plasma. *PLoS One* 6 (2011) e24145.
- [14] P. Mestdagh, P. Van Vlierberghe, A. De Weer, D. Muth, F. Westermann, F. Speleman, and J. Vandesompele, A novel and universal method for microRNA RT-qPCR data normalization. *Genome Biol* 10 (2009) R64.
- [15] K.J. Livak, and T.D. Schmittgen, Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C(T))} Method. *Methods* 25 (2001) 402-8.
- [16] F. Azouz, K. Arora, K. Krause, V.R. Nerurkar, and M. Kumar, Integrated MicroRNA and mRNA Profiling in Zika Virus-Infected Neurons. *Viruses* 11 (2019).
- [17] J. Louten, M. Beach, K. Palermino, M. Weeks, and G. Holenstein, MicroRNAs Expressed during Viral Infection: Biomarker Potential and Therapeutic Considerations. *Biomark Insights* 10 (2015) 25-52.
- [18] X. Xiong, J. Deng, C. Zeng, Y. Jiang, S. Tang, and X. Sun, MicroRNA-141 is a tumor regulator and prognostic biomarker in human glioblastoma. *Oncol Lett* 14 (2017) 4455-4460.
- [19] R.A. Kozak, A. Majer, M.J. Biondi, S.J. Medina, L.W. Goneau, B.V. Sajesh, J.A. Slota, V. Zubach, A. Severini, D. Safronetz, S.L. Hiebert, D.R. Beniac, T.F. Booth, S.A. Booth, and G.P. Kobinger, MicroRNA and mRNA Dysregulation in Astrocytes Infected with Zika Virus. *Viruses* 9 (2017).
- [20] L. Zhao, X. Zhang, Z. Wu, K. Huang, X. Sun, H. Chen, and M. Jin, The Downregulation of MicroRNA hsa-miR-340-5p in IAV-Infected A549 Cells Suppresses Viral Replication by Targeting RIG-I and OAS2. *Mol Ther Nucleic Acids* 14 (2019) 509-519.
- [21] Z. Xu, S.B. Xiao, P. Xu, Q. Xie, L. Cao, D. Wang, R. Luo, Y. Zhong, H.C. Chen, and L.R. Fang, miR-365, a novel negative regulator of interleukin-6 gene expression, is cooperatively regulated by Sp1 and NF-kappaB. *J Biol Chem* 286 (2011) 21401-12.
- [22] K.D. Pavelko, C.L. Howe, K.M. Drescher, J.D. Gamez, A.J. Johnson, T. Wei, R.M. Ransohoff, and M. Rodriguez, Interleukin-6 protects anterior horn neurons from lethal virus-induced injury. *J Neurosci* 23 (2003) 481-92.

- [23] S. Wang, X. Zhang, Y. Ju, B. Zhao, X. Yan, J. Hu, L. Shi, L. Yang, Z. Ma, L. Chen, Y. Liu, Z. Duan, X. Chen, and S. Meng, MicroRNA-146a feedback suppresses T cell immune function by targeting Stat1 in patients with chronic hepatitis B. *J Immunol* 191 (2013) 293-301.
- [24] J.C. Henry, J.K. Park, J. Jiang, J.H. Kim, D.M. Nagorney, L.R. Roberts, S. Banerjee, and T.D. Schmittgen, miR-199a-3p targets CD44 and reduces proliferation of CD44 positive hepatocellular carcinoma cell lines. *Biochem Biophys Res Commun* 403 (2010) 120-5.
- [25] F. Fornari, M. Milazzo, P. Chieco, M. Negrini, G.A. Calin, G.L. Grazi, D. Pollutri, C.M. Croce, L. Bolondi, and L. Gramantieri, MiR-199a-3p regulates mTOR and c-Met to influence the doxorubicin sensitivity of human hepatocarcinoma cells. *Cancer Res* 70 (2010) 5184-93.
- [26] M. Baz-Martinez, S. Da Silva-Alvarez, E. Rodriguez, J. Guerra, A. El Motiam, A. Vidal, T. Garcia-Caballero, M. Gonzalez-Barcia, L. Sanchez, C. Munoz-Fontela, M. Collado, and C. Rivas, Cell senescence is an antiviral defense mechanism. *Sci Rep* 6 (2016) 37007.
- [27] X. Guo, Y. Wu, and R.S. Hartley, MicroRNA-125a represses cell growth by targeting HuR in breast cancer. *RNA Biol* 6 (2009) 575-83.
- [28] S. Shwetha, G. Sharma, H. Raheja, A. Goel, R. Aggarwal, and S. Das, Interaction of miR-125b-5p with Human antigen R mRNA: Mechanism of controlling HCV replication. *Virus Res* 258 (2018) 1-8.
- [29] B. Herdy, T. Karonitsch, G.I. Vladimer, C.S. Tan, A. Stukalov, C. Trefzer, J.W. Bigenzahn, T. Theil, J. Holinka, H.P. Kiener, J. Colinge, K.L. Bennett, and G. Superti-Furga, The RNA-binding protein HuR/ELAVL1 regulates IFN-beta mRNA abundance and the type I IFN response. *Eur J Immunol* 45 (2015) 1500-11.
- [30] I.J. Ezeonwumelu, E. Garcia-Vidal, and E. Ballana, JAK-STAT Pathway: A Novel Target to Tackle Viral Infections. *Viruses* 13 (2021).
- [31] K.R. Martins, C.S. Haas, J.G. Ferst, M.T. Rovani, A.L.F. Goetten, R. Duggavathi, V. Bordignon, V.V.M. Portela, Jr., R. Ferreira, P.B.D. Goncalves, B.G. Gasperin, and T. Lucia, Jr., Oncostatin M and its receptors mRNA regulation in bovine granulosa and luteal cells. *Theriogenology* 125 (2019) 324-330.
- [32] C.Z. Chen, L. Li, H.F. Lodish, and D.P. Bartel, MicroRNAs modulate hematopoietic lineage differentiation. *Science* 303 (2004) 83-6.
- [33] R.K. Seong, J.K. Lee, G.J. Cho, M. Kumar, and O.S. Shin, mRNA and miRNA profiling of Zika virus-infected human umbilical cord mesenchymal stem cells identifies miR-142-5p as an antiviral factor. *Emerg Microbes Infect* 9 (2020) 2061-2075.

[34] M.M. Berrien-Elliott, Y. Sun, C. Neal, A. Ireland, M.C. Trissal, R.P. Sullivan, J.A. Wagner, J.W. Leong, P. Wong, A.Y. Mah-Som, T.N. Wong, T. Schappe, C.R. Keppel, V.S. Cortez, E.G. Stamatiades, M.O. Li, M. Colonna, D.C. Link, A.R. French, M.A. Cooper, W.L. Wang, M.P. Boldin, P. Reddy, and T.A. Fehniger, MicroRNA-142 Is Critical for the Homeostasis and Function of Type 1 Innate Lymphoid Cells. *Immunity* 51 (2019) 479-490 e6.

ANEXO A

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, sou a pesquisadora responsável pelo projeto e minha área de atuação é Imunologia de doenças infecciosas. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, assine em todas as folhas e ao final deste documento, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisadora, em todas as folhas. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Dra Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, no telefone: (62) 3946-1346. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo telefone (62) 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: “Perfil da expressão gênica em amostras de sangue de indivíduos infectados pelo vírus zika nas fases aguda e de convalescença”.

O vírus Zika (ZIKV) é transmitido principalmente pela picada de mosquitos Aedes, e somente 20% dos indivíduos infectados com o vírus apresentarão sintomas da doença. Além disso, existe apenas um tipo de vírus circulante, mas que pode apresentar alterações em sua estrutura de acordo com a região em que se desenvolve.

Em geral, os casos que apresentam sintomas exibem um quadro semelhante ao da Dengue e Chikungunya, com as seguintes sintomatologias: febre, dor de cabeça, dor articular e muscular, e manchas vermelhas espalhadas pelo corpo.

Nesse projeto pretendemos realizar um estudo capaz de identificar quais as alterações no sistema imune que podem ser ocasionadas pela presença do Zika Vírus e detectar qual o tipo de vírus que o indivíduo com Zika está infectado, bem como se existe alterações na estrutura do vírus que circula no Brasil.

Assim, nossa hipótese é que há a alteração no sistema imune de indivíduos que estão infectados com o Zika vírus e que o vírus circulante no Brasil não apresenta muitas alterações em sua estrutura.

Acreditamos que a identificação das alterações no sistema imune e da estrutura viral, será útil para tratar o paciente, estratégias de controle de mosquitos e diferenciar de outras doenças também causadas pela picada de insetos.

Objetivos da pesquisa: Detectar a infecção pelo Vírus Zika em indivíduos com suspeita da doença; Quantificar o vírus Zika nos indivíduos infectados; Determinar características do sistema imune em infectados com o ZIKV e estrutura viral do mesmo.

Duração do estudo: Esse estudo está previsto para durar 2 anos. A sua participação nessa pesquisa será o tempo gasto no momento da coleta de sangue e coleta de informações para o preenchimento da ficha de investigação, com duração de 15 a 20 minutos.

Procedimentos a serem seguidos durante o estudo: Será preenchida uma ficha de investigação e, se for necessário, seu prontuário médico também poderá ser observado, para que os resultados de todos os exames que você já realizou sejam avaliados pelos pesquisadores. Serão colhidos 10 mL de sangue de sua veia para realização de testes que avaliarão se você está com o Zika Vírus, quanto de vírus há em seu organismo, para que possamos compreender como o vírus age e como pode ser combatido.

Desconfortos e riscos potenciais: Esta pesquisa por necessitar da obtenção de amostras de sangue, é considerada de risco médio, porque gera desconforto, dor durante a coleta, formação de manchas roxas no local da coleta de sangue e, ainda, tonturas. Para minimizar tais problemas, será utilizada nesta pesquisa, sala reservada para entrevista e coleta de amostra; o profissional que realizará a coleta de sangue é muito experiente e trabalha somente com coleta de sangue; todo o procedimento antes e após a coleta seguirá os padrões de segurança e Boas Práticas Laboratoriais.

Benefícios que poderão ser obtidos: Você receberá resultados de exames laboratoriais (PCR para Zika e Chikungunya) sem qualquer custo. Também será

orientado quanto ao curso e desenvolvimento da doença, será aconselhado sobre como proceder após o recebimento dos resultados. Sua participação beneficiará outras pessoas por promover melhor entendimento de fatores relacionados com a origem, ao curso do Zika Vírus e reações no organismo, tratamento e desenvolvimento de vacinas, bem como cuidados relacionados ao combate do mosquito.

Compensações e custos: Todas as consultas, procedimentos e testes laboratoriais feitos especificamente para este estudo serão fornecidos a você sem nenhum custo. A equipe pesquisadora se dispõe em oferecer a você assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios em função da sua participação no estudo, afim de minimizar os transtornos causados.

Descontinuação do Estudo: Você poderá deixar de participar deste estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento que achar necessário sem prejuízos em seu atendimento hospitalar e sem nenhum dano moral, ético, social, financeiro, etc.

Esclarecimentos dados sobre garantias do participante da pesquisa:

- Você terá a garantia, a qualquer tempo de que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida;
- Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação a qualquer tempo. A participação é voluntária e a recusa em participar não envolverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Recusa ou descontinuação não irão de nenhuma forma colocar em risco seu direito de receber tratamento.
- Seu médico e os demais investigadores desse estudo tratarão sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Seus registros permanecerão confidenciais. Nomes de participantes ou materiais identificando participantes não serão publicados. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento ficará com esta equipe de pesquisa e uma será dada a você.

Todos os procedimentos e consultas deste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica por danos causados direta e indiretamente relacionados com este estudo serão de responsabilidade desta equipe pesquisadora.

Eu, _____,
 RG/ CPF/ nº de prontuário/ nº de matrícula _____,
 abaixo assinado, concordo em participar do estudo “Perfil da expressão gênica em amostras de sangue de indivíduos infectados pelo vírus zika nas fases aguda e de convalescença”, sob a responsabilidade da Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação. Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

Nome _____ e Assinatura _____ do
 participante: _____

Assinatura Dactiloscópica:

Nome _____ e assinatura _____ do Pesquisador
 Responsável: _____

REFERÊNCIAS

1. ALVAREZ-BUYLLA ER, BENITEZ M, DAVILA EB, et al., Gene regulatory network models for plant development. *Current Opinion in Plant Biology* 2007, 10:83–91.
2. ACHKAR, Natalia P; CAMBIAGNO, Damián A; MANAVELLA, Pablo A. miRNA Biogenesis : A Dynamic Pathway. **Trends in Plant Science** v. 21, n. 12, p. 1034–1044 , 2016. Disponível em:
<<http://dx.doi.org/10.1016/j.tplants.2016.09.003>>.
3. AZOUZ F, et al. Integrated MicroRNA and MRNA Profiling in Zika Virus-Infected Neurons. *Viruses*. 11:162, 2019.
4. BRASIL. Microcefalia - Ministério da Saúde divulga boletim epidemiológico. Available at:
<http://portalsaude.saude.gov.br/index.php/cidadao/principal/agencia-saude/20925-ministerio-divulga-boletim-epidemiologico>. 2019.
5. CALVET, Guilherme *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil : a case study. v. 3099, n. 16, p. 1–8 , 2016.
6. CASTRO, Fernanda L *et al.* MicroRNAs 145 and 148a Are Upregulated During Congenital Zika Virus Infection. , 2019.
7. CUGOLA FR, FERNANDES IR, RUSSO FB, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 534:267-71, 2016.
8. CHAMBERS, Thomas J *et al.* AND REPLICATION ORGJ \ NIZATION , EXPRESSION , 1. , 1990.
9. CHOUIN-CARNEIRO, Thais *et al.* Differential Susceptibilities of Aedes

- aegypti and *Aedes albopictus* from the Americas to Zika Virus. p. 1–11 ,
2016.
10. DICK GW, Haddow AJ. Uganda S virus; a hitherto unrecorded virus isolated from mosquitoes in Uganda. I. Isolation and pathogenicity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46:600-18.
 11. DICK GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952; 46:509-20.
 12. FARIA, Nuno Rodrigues *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. v. 352, n. 6283 , 2016.
 13. FAYE, Oumar *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20 th Century. v. 8, n. 1, p. 1–10 , 2014.
 14. GUZMAN, Maria G *et al.* Europe PMC Funders Group Dengue : a continuing global threat Europe PMC Funders Author Manuscripts. v. 8, n. 12 0, p. 1–26 , 2015.
 15. HADDOW, Andrew D *et al.* Genetic Characterization of Zika Virus Strains : Geographic Expansion of the Asian Lineage. v. 6, n. 2 , 2012.
 16. HAMEL, Rodolphe *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. v. 89, n. 17, p. 8880–8896 , 2015.
 17. HAYES, Edward B. Zika Virus Outside Africa. v. 15, n. 9, p. 2007–2010 , 2009.
 18. JOPLING, Catherine L *et al.* Modulation of Hepatitis C Virus RNA Abundance by a Liver-Specific MicroRNA. v. 1577, n. 2005 , 2012.
 19. LANCIOTTI, Robert S *et al.* Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic , Yap State ,. v. 14, n. 8 , 2008.
 20. LEE RC, FEINBAUM RL, AMBROS V. The *C. elegans* heterochronic gene

- lin-4 encodes small RNAs with antisense complementarity to lin-14. *Cell*. 75:843-54, 1993.
21. LINDENBACH BD, RICE CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 59:23-61, 2003.
22. MITCHELL, Patrick S *et al*. Circulating microRNAs as stable blood-based markers for cancer detection. , 2008.
23. MACNAMARA FN. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 48:139-45, 1954.
24. MUSSO, Didier *et al*. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. v. 21, n. 2, p. 2013–2015 , 2015.
25. NÓBREGA MEB, ARAÚJO ELL, WADA MY, et al. Surto de síndrome de Guillain-Barré possivelmente relacionado à infecção prévia pelo vírus Zika, Região Metropolitana do Recife, Pernambuco, Brasil, 2015. *Epidemiol. Serv. Saúde*. 27 (2) 21, 2018.
26. OEHLER, E *et al*. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report , French Polynesia , December 2013. v. 1, n. December 2013, p. 7–9 , 2014.
27. OUYANG, Xiaoxi *et al*. Dysregulated Serum MiRNA Profile and Promising Biomarkers in Dengue-infected Patients. v. 13 , 2016.
28. PASQUINELLI AE, REINHART BJ, SLACK F, et al. Conservation of the sequence and temporal expression of let-7 heterochronic regulatory RNA. *Nature*. 408:86-9, 2000.
29. PETERSEN LR, JAMIESON DJ, POWERS AM, HONEIN MA. Zika Virus. *N Engl J Med*. 374:1552-63, 2016.

30. REINHART BJ, SLACK FJ, BASSON M, et al. The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*. 403:901-6, 2000.
31. ROOIJ, Eva Van. *The Art of MicroRNA Research*. v. 108, n. 2, p. 219–234 , 2011.
32. Simpson DI. ZIKA VIRUS INFECTION IN MAN. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1964; 58:335-8.
33. TAHAMTAN, Alireza *et al.* The role of microRNAs in respiratory viral infection : friend or foe ? , 2016.
34. TAKEUCHI, Osamu *et al.* *HHS Public Access*. v. 227, n. 1, p. 75–86 , 2017.
35. TIJSEN, Anke J; PINTO, Yigal M; CREEMERS, Esther E. Circulating microRNAs as diagnostic biomarkers for cardiovascular diseases. , 2012.
36. WHO. Zika Epidemiology. Disponível em:
<<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/epidemiology-update/en/>>.
Acesso em 10 de dezembro de 2019.

CONGRESSOS E PRODUÇÃO CIENTÍFICA DURANTE O DOUTORADO

- **Cursos:**

- Flowjo analyses – BD Bioscience (2018)
- RNA's não codificantes (2018) - UFMG, Brasil
- Análise Metabolômica e Lipidômica utilizando Espectrometria de Massas. (2018) - Sociedade Brasileira de Espectrometria de Massas, SBEM, Brasil.
- Bioinformática: Introdução a Análise de Redes Biológicas – CT Vacinas, CT VACINAS, Brasil (2019).
- Introdução à Computação para Bioinformática (linguagem de programação Python) – Departamento de Ciências da Computação da UFMG (2020).

Trabalhos de primeira autoria publicados:

- Differential expression of *Acanthamoeba castellanii* proteins during amoebic keratitis in rats. 2021. DOI: 10.1016/j.exppara.2020.108060

Trabalhos de primeira aceitos para publicação:

- A major downregulation of circulating microRNAs in Zika acutely infected patients: potential implications in Innate and Adaptive Immune Response Signaling Pathways. 2022. *Frontiers in Genetics*.

Trabalhos publicados como colaboradora:

- Cardiac MicroRNA Expression Profile After Experimental Brain Death Is Associated With Myocardial Dysfunction and Can Be Modulated by Hypertonic Saline. 2021. *Transplantation*. DOI: 10.1097/TP.0000000000003779

- Integrative analysis of microRNA and mRNA expression profiles of monocyte derived dendritic cells differentiation during experimental cerebral malária. 2020. Journal of Leucocyte Biology. DOI: 10.1002/JLB.1MA0320-731R

- Immune and metabolic shifts during neonatal development reprogram liver identity and function. 2018. DOI:10.1016/j.jhep.2018.08.018

- **Artigos submetidos como colaboradora:**

MiRNA-30d and miR-770-5p as potential clinical risk predictors of Vasoplegic Syndrome in Patients undergoing on-pump coronary artery bypass grafting. 2022. Frontiers in Cardiovascular Medicine

Participação em eventos:

- o MEDTROP/Parasito, 2019.
- o 7th conference on mass spectrometry, 2018.
- o Gente time conference, 2018.
- o I immunonutri, 2018.
- o I Congresso de Mulheres na Ciência da UFMG, 2018.
- o XLIII Congress of the Brazilian Society of Immunology and XI Extra Section of Clinical Immunology, 2018.

- **Resumos publicados em anais de eventos:**

- o ANA CAROLINA CARVALHO-SILVA, ALMIR RIBEIRO DA SILVA JUNIOR, VAGNER OLIVEIRA-CARVALHO RIGAUD, WALESKA MARTINS GARDESANI, VERÔNICA COELHO, IRMTRAUT ARACI HOFFMANN PFRIMER, JORGE KALIL³, SIMONE DA FONSECA, EDECIO CUNHA-NETO &, LUDMILA RODRIGUES PINTO FERREIRA. A major downregulation of circulating microRNAs in Zika acutely infected patients:

potential implications in Innate and Adaptive Immune Response Signaling Pathways. In: IMMUNO 2020. Evento on-line.

o MAFRA, K. ; NAKAGAKI, B. N. ; ANTUNES, M. M. ; OLIVEIRA, H. M. C. ; MIRANDA, C. D. M. ; GONTIJO, R. C. ; LOPES, M. E. ; MATTOS, M. S. ; DINIZ, A. B. ; LOPES, M. A. F. ; SILVA, A. C. C. ; MENEZES, G. B. . Evaluation of the expression profile of genes involved in hepatic metabolism from birth to adulthood. In: Gene time conference, 2018, Belo Horizonte. Gene time conference, 2018.

o EULA GRACIELE AMORIM NEVES, EULA GRACIELE AMORIM NEVES, CAROLINA CATTONI KOH, FERNANDA NOBRE AMARAL VILLANI, JANETE SOARES COELHO DOS SANTOS, LIVIA SILVA ARAÚJO PASSOS, ANA CAROLINA CARVALHO SILVA, VICENTE REZENDE SILVA, JULIA PEREIRA AFONSO DOS SANTOS, KENNETH JOHN GOLLOB, MARIA DO CARMO PEREIRA NUNES, WALDEREZ ORNELAS DUTRA. Avaliação dos níveis plasmáticos de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento apontam para singularidade imunológica da cardiomiopatia chagásica comparada à outras cardiopatias. 55º Congresso da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical e XXVI Congresso Brasileiro de Parasitologia, 2019.

• **Participação em bancas avaliadoras:**

o Avaliadora de Trabalho Interdisciplinar Supervisionado do Curso de Nutrição da FAMINAS/BH (2019).

o Avaliadora de Trabalho Interdisciplinar Supervisionado do Curso de Nutrição da FAMINAS/BH (2018).

o Comissão Avaliadora da IV Mostra Interativa da Pós-graduação, durante o 4º Encontro de Ciência, Ensino e Cultura do ICB/UFMG, dentro da Semana do Conhecimento, Universidade Federal de Minas Gerais (2018).

o Comissão Avaliadora do “2º CONCURSO DO PITCH” na IV Mostra Interativa da Pós-graduação, do 4º Encontro de Ciência, Ensino e Cultura do

ICB/UFMG”, dentro da Semana do Conhecimento da UFMG, Universidade Federal de Minas Gerais (2018).

- **Mesas redondas, programas de televisão e eventos para divulgação da ciência:**

- o Percurso acadêmico-profissional dos egressos da FAMINAS-BH, 2017.
- o As dificuldades dos cientistas no financiamento de suas pesquisas. Jornal da UFMG, 2017

- **Organização de eventos:**

- o III Encontro Nacional do PROFBIO. 2019
- o MEDTROP/Parasito 2019.
- o I imunonutri. 2018.
- o IV Mostra Interativa da Pós-Graduação. 2018.
- o III Encontro Nacional do PROFBIO. 2018.
- o III Mostra interativa do terceiro encontro de Ciência, Cultura e Arte do ICB. 2017.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS PRÓ-REITORIA DE
PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA

COLABORADORES:

Profa. Dra. Simone Fonseca UFG

Profa. Dra. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer UFG

Prof. Dr. Edecio Cunha Neto INCOR

Prof. Dr. Jorge Kalil INCOR

Almir Ribeiro da Silva Junior

INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES

Universidade Federal de Goiás

Pontifícia Universidade Católica de Goiás

Instituto do Coração - Hospital das Clínicas da Universidade de São Paulo (INCOR)

RECURSOS FINANCEIROS

Programa Institucional de Auxílio à Pesquisa de Doutores Recém-contratados da UFMG.

Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - CAPES (Bolsa de doutorado)

Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP)

INCT-V Instituto nacional de ciência e tecnologia de vacinas (CNPq)