

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Letícia Maria Soares Azevedo

**Análise do Transcriptoma de Córtex Cerebral da Prole de
Camundongos Infectados por Zika virus**

Belo Horizonte

2022

Universidade Federal de Minas Gerais
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Microbiologia

Letícia Maria Soares Azevedo

**Análise do Transcriptoma de Córtex Cerebral da Prole de
Camundongos Infectados por Zika virus**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas: Microbiologia.

Orientadora: Dra. Daniele da Glória de Souza
Co-orientadores: Dr. Diego Lisboa Rios
Dr. Vidyleison Neves Camargos

Belo Horizonte

2022

043 Azevedo, Letícia Maria Soares.
Análise do transcriptoma de córtex cerebral da prole de camundongos infectados por Zika vírus [manuscrito] / Letícia Maria Soares Azevedo. – 2022. 109 f. : il. ; 29,5 cm.

Orientadora: Dra. Daniele da Glória de Souza. Co-orientadores: Dr. Diego Lisboa Rios, Dr. Vidyleison Neves Camargos.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Instituto de Ciências Biológicas. Programa de Pós-Graduação em Microbiologia.

1. Microbiologia. 2. Zika virus. 3. Transcriptoma. 4. Coinfecção. I. Souza, Daniele da Glória de. II. Rios, Diego Lisboa. III. Camargos, Vidyleison Neves. IV. Universidade Federal de Minas Gerais. Instituto de Ciências Biológicas. V. Título.

CDU: 579



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
CURSO DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MICROBIOLOGIA

ATA DE DEFESA DE DISSERTAÇÃO

ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DE LETÍCIA MARIA SOARES AZEVEDO

Nº REGISTRO: 2020682650

Às 14:00 horas do dia **27 de JANEIRO de 2022**, reuniu-se, por via remota, a Comissão Examinadora composta pelos Drs. Aristóteles Góes-Neto (Departamento de Microbiologia/ICB/UFMG) e Fernanda Martins Marim (Departamento de Genética, Ecologia e Evolução/ ICB/UFMG), Diego Lisboa Rios - Coorientador, Vidyleison Neves Camargos - Coorientador e a Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza – Orientadora, para julgar o trabalho final “Análise do Transcriptoma de Córtex Cerebral da Prole de Camundongos Infectados por ZIKV”, da aluna **Letícia Maria Soares Azevedo**, requisito final para a obtenção do Grau de **MESTRE EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS: MICROBIOLOGIA**. Abrindo a sessão, o Presidente da Comissão, Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza - orientadora, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra à candidata, para a 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. A candidata foi considerada **APROVADA**. O resultado final foi comunicado publicamente à candidata pelo 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. A candidata tem 60 (sessenta) dias, a partir desta data, para entregar a versão final da dissertação ao Programa de Pós-graduação em Microbiologia da UFMG e requerer seu diploma.

Belo Horizonte, 27 de janeiro de 2022

Membros da banca:

Prof. Dr. Aristóteles Góes-Neto

Dra. Fernanda Martins Marim

De acordo:

Profa. Dra. Daniele da Glória de Souza

(Orientadora)

Dr. Diego Lisboa Rios

(Coorientador)

Dr. Vidyleison Neves Camargos

(Coorientador)

Prof. Daniel de Assis Santos

(Subcoordenador do PPGM/UFMG)



Documento assinado eletronicamente por **Aristoteles Goes Neto, Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 14:51, 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 **Daniel de Assis Santos, Professor do Magistério Superior**, em 28/01/2022, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 5º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por **Diego Lisboa Rios, Usuário Externo**, em 31/01/2022, às 09:21, 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 **Fernanda Martins Marim, Usuário Externo**, em 01/02/2022, às 10:34, 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 **Vidyleison Neves Camargos, Usuário Externo**, em 09/02/2022, às 11:53, 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 **Daniele da Gloria de Souza, Coordenador(a) de curso de pós-graduação**, em 10/02/2022, às 08:30, 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 **1167574** e o código CRC **6A1393F8**.

AGRADECIMENTOS

A Deus pelo dom da vida e por ter me capacitado para chegar até aqui de forma honesta e justa. Por nunca me abandonar, por me guiar e iluminar e pela oportunidade que ele me ofereceu, através da intercessão de Nossa Senhora da Conceição, que também nunca me desamparou e me ajudou a chegar até aqui e a ter vivido tudo isso com felicidade e fé, tanto nos momentos bons quanto nos ruins.

Aos meus pais, Ariádine e Maurício, por jamais medirem esforços e por todo o sacrifício que fizeram para eu ter uma boa formação. Pelo amor, carinho, respeito, cuidado, apoio, compreensão, fé e inspiração. Essa conquista não é só minha, mas também de vocês. À minha irmã Ana Carolina, pela amizade, amor, compreensão e por me apoiar e ajudar. Aos meus avós pela inspiração e por todo amor, cuidado e por serem exemplo de vida e de fé. Aos meus amigos, pelo apoio, carinho e paciência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia da UFMG, funcionários e professores pela dedicação e excelência no ensino. À UFMG e ao ICB pelo acolhimento e infraestrutura. Aos pesquisadores do Departamento de Microbiologia pelo conhecimento e experiências trocadas. Ao CNPq e demais órgãos de fomento pelo apoio financeiro.

Aos meus orientadores Danielle, Vidyleison e Diego pela confiança e por terem acreditado em mim. Obrigada por todo conhecimento, ensinamento, experiência, apoio, sabedoria, paciência e compreensão. Muito obrigada! Ao LIMHO e todos os seus membros, pela acolhida, experiência, pelos bons frutos e amigos que contribuíram muito para a minha formação.

RESUMO

O Zika vírus (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae* e sua sintomatologia está associada a sinais clínicos como febre aguda, dor de cabeça, mialgia, exantema maculopapular, dor de garganta e edema nos membros inferiores. Também são observadas complicações neurológicas associadas à infecção por esse vírus, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) e a microcefalia em recém-nascidos, além de anomalias fetais, no qual é definido como Síndrome Congênita do Zika (SCZ). Mas as consequências da infecção na fase adulta ainda são investigadas, principalmente no contexto de co-circulação de outros flavivírus, que podem acarretar no fenômeno de ADE (aumento da infecção dependente de anticorpos). Por isso, o objetivo desse trabalho foi, através da análise de transcriptoma, avaliar a expressão de genes diferenciais na prole nascida de mães infectadas por ZIKV, na presença ou ausência de anticorpos anti-flavivírus. Para tal, camundongo fêmeas grávidas foram inoculadas com 1×10^6 UFP/animal de ZIKV por via intraperitoneal no dia embrionário 5,5, na presença ou ausência de 4G2. Após 12 semanas do nascimento da prole, os filhotes foram eutanasiados e o córtex cerebral coletado para análise do transcriptoma. Foram sequenciados 6 amostras de cada grupo por meio do equipamento *HiSeq 2500* (Illumina, San Diego, CA, USA). A análise de transcriptoma seguiu os seguintes passos: controle de qualidade, alinhamento, sumarização, quantificação, normalização, análise de expressão diferencial e análise de enriquecimento de genes sets. Os grupos animais foram comparados entre si, sendo eles PBS, ZIKV e 4G2+ZIKV. Foram observados poucos genes diferencialmente expressos quando comparado PBS e ZIKV, sendo a maioria suprimida e estão relacionados principalmente ao ciclo celular e a morfogênese. Em contrapartida, quando comparado ZIKV e 4G2+ZIKV, foi observados uma quantidade grande de genes sendo ativados, referentes à resposta imunológica e produção de citocinas e mediadores inflamatórios, os quais alteraram vias importantes na tentativa do organismo hospedeiro em conter a infecção. Também foi observada a repressão de processos celulares e morfológicos, que corroboram com a patogenia da ZIKV, principalmente no desenvolvimento do sistema nervoso. As alterações neurológicas foram mais bem observadas na análise de *splicing* alternativo que revelou transcritos provindos de genes distintos àqueles diferencialmente expressos e que alteram principalmente o desenvolvimento

neurológico no grupo com a presença de 4G2. Dessa forma, a análise do transcriptoma elucidou a gravidade de co-infecções no contexto de ZIKV, ao observar alterações genéticas e metabólicas mais acentuadas na presença de 4G2, que contribuem para um fenótipo mais grave e complicações na fase adulta do indivíduo.

Palavras-chave: Zika virus, Transcriptoma, Aumento da infecção dependente de anticorpos, Síndrome Congênita do Zika.

ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus that belongs to the *Flaviviridae* family and its symptoms are associated with clinical signs as acute fever, headache, myalgia, maculopapular rash, sore throat and edema in the lower limbs. Neurological complications associated with this virus infection are also observed, as Guillain-Barré Syndrome (GBS) and microcephaly in newborns, further fetal anomalies, in which is defined as Congenital Zika Syndrome (CZS). But the consequences of infection in adulthood are still being investigated, especially in the context of co-circulation of other flaviviruses, which can cause the phenomenon of ADE (Antibody-Dependent Enhancement). Therefore, the objective of this work was, through transcriptome analysis, to evaluate the expression of differential genes in offspring born from mothers infected with ZIKV, in the presence or absence of anti-flavivirus antibodies. For this, pregnant female mice were inoculated with 1×10^6 PFU/animal of ZIKV intraperitoneally on embryonic day 5.5, in the presence or absence of 4G2. After 12 weeks of offspring birth, the puppies were euthanized and the cerebral cortex was collected for transcriptome analysis. Six samples from each group were sequenced using the *HiSeq 2500* equipment (Illumina, San Diego, CA, USA). The transcriptome analysis followed the steps: quality control, alignment, summarization, quantification, normalization, differential expression analysis and analysis of set gene enrichment. The animal groups were compared to each other, which are PBS, ZIKV and 4G2+ZIKV. Few differentially expressed genes were observed when comparing PBS and ZIKV, most of which were suppressed and are mainly related to cell cycle and morphogenesis. On the other hand, when comparing ZIKV and 4G2+ZIKV, a large amount of genes activated was observed, referring to the immune response and production of cytokines and inflammatory mediators, which altered important pathways in the host organism's attempt to contain the infection. The repression of cellular and morphological processes was also observed, which corroborate the pathogenesis of ZIKV, especially in the development of the nervous system. Neurological alterations were better observed in the analysis of alternative *splicing*, which revealed transcripts originating from genes different from those differentially expressed, which mainly change neurological development in the group with the presence of 4G2. Therefore, the transcriptome analysis elucidates the severity of co-infections in the context of ZIKV, by observing more accentuated genetic and

metabolic alterations in the presence of 4G2, which contribute to a more severe phenotype and complications in the individual's adult phase.

Keywords: Zika virus, Transcriptoma, Antibody-Dependent Enhancement, Congenital Zika Syndrome.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Distribuição de casos confirmados de infecção por ZIKV entre 2015 e 2020.....	22
Figura 2: Representação do genoma do ZIKV e as proteínas codificadas.....	24
Figura 3: Ciclo de Multiplicação do ZIKV.....	26
Figura 4: Fluxograma de obtenção e análise de RNA-seq.....	35
Figura 5: Estratégia experimental.....	41
Figura 6: Diagrama de Venn.....	45
Figura 7: Volcano plot V1XV2.....	48
Figura 8: Volcano plot V2XV3.....	49
Figura 9: <i>Dot plot</i> V1XV2.....	53
Figura 10: <i>Dot plot</i> V2XV3.....	55
Figura 11: <i>Ridge plot</i> V1XV2.....	56
Figura 12: <i>Ridge plot</i> V2XV3.....	57
Figura 13: <i>Gsea Plot</i> para cascata de coagulação e sistema complemento V1XV2.....	59
Figura 14: <i>Gsea Plot</i> para cascata de coagulação e sistema complemento V2XV3.....	59
Figura 15: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização JAK-STAT V2XV3.....	60
Figura 16: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização NOD-like V2XV3.....	60
Figura 17: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização FoxO V2XV3.....	61
Figura 18: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização Wnt V2XV3.....	62
Figura 19: <i>Circos plot</i> V1XV2 – Função Molecular.....	65
Figura 20: <i>Circos plot</i> V1XV2 – Processo Biológico.....	66
Figura 21: <i>Circos plot</i> V1XV2 – Componente Celular.....	67
Figura 22: <i>Circos plot</i> V2XV3 – Função Molecular.....	68
Figura 23: <i>Circos plot</i> V2XV3 – Processo Biológico.....	69
Figura 24: <i>Circos plot</i> V2XV3 – Componente Celular.....	70
Figura 25: Volcano plot V1XV3.....	105
Figura 26: <i>Dot plot</i> V1XV3.....	106
Figura 27: <i>Ridge plot</i> V1XV3.....	107

Figura 28: <i>Gsea Plot</i> para cascata de coagulação e sistema complemento V1XV3.....	107
Figura 29: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização JAK-STAT V1XV3.....	108
Figura 30: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização NOD-like V1XV3.....	108
Figura 31: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização FoxO V1XV3.....	109
Figura 32: <i>Gsea Plot</i> para via de sinalização Wnt V1XV3.....	109

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Métricas do Sequenciamento.....	44
Tabela 2: Genes diferencialmente expressos em V1XV2.....	45
Tabela 3: Genes diferencialmente expressos em V2XV3.....	45
Tabela 4: Genes diferencialmente expressos em V1XV3.....	104
Tabela 5: Análise da função dos genes diferencialmente expressos em V1XV2.....	110
Tabela 6: Análise da função dos genes diferencialmente expressos em V2XV3.....	110
Tabela 7: Análise da função dos genes diferencialmente expressos em V1XV3.....	111

LISTA DE ABREVIÇÕES E SIGLAS

4G2 - Anticorpo Monoclonal Anti-proteína E de Flavivírus

ADE - *Antibody-Dependent Enhancement*

AIM – Ativação Imune Materna

Akt-mTOR – Via de sinalização intracelular (proteína quinase B - alvo mecanístico da rapamicina)

Anti-DENV – Anticorpos contra *Dengue virus*

Anti-ZIKV – Anticorpos contra *Zika virus*

AXL – Receptor tirosino-quinase AXL

BA - Bahia

BAM – *Binary Alignment Map*

BOD - Demanda Bioquímica de Oxigênio

C – Proteína do Capsídeo

cDNA – DNA complementar

CH25H – Colesterol 25 hidroxilase

CHIKV – *Chikungunya virus*

CO₂ – Dióxido de Carbono

COM - *Counts per million*

DC-SIGN – Receptor *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3Grabbing Non-integrin*

DE – Dia Embrionário

DENV – *Dengue virus*

DNA – Ácido desoxirribonucleico

DPN – Dia pós-natal

E – Glicoproteína de Envelope

EBV - Vírus Epstein-Barr

FC – Fragmento cristalizável

FOX - *Forkhead box*

GDE – Gene diferencialmente expresso

GTF - *Gene transfer format*

HIV – Vírus da Imunodeficiência Humana

IBGE – Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

IFN - Interferon

Ig – Imunoglobulinas

IL – Interleucina

i.p. – Via Intraperitoneal

JAK-STAT – Via de Sinalização (Janus quinases - transdutor de sinal e ativador de proteínas de transcrição)

JEV – Vírus da Encefalite Japonesa

logCPM – *log counts per million*

logFC - *log2 FoldChange*

M – Glicoproteína de Envelope

MAMPs - Padrões moleculares associados a microrganismos

MAPK - *Mitogen Activated Protein Kinases*

MDA-5 – Proteína 5 associada à diferenciação de melanoma

Mer – Receptor tirosino-quinase

MHC – Complexo principal de histocompatibilidade

miRNA – Micro RNA

MLG - Modelo Linear Generalizado

mRNA – RNA mensageiro

NaCl – Cloreto de Sódio

NaPO₄ – Fosfato de Sódio

NGS – *Next Generation Sequencing*

NS – Proteína não estrutural

OMS – Organização Mundial da Saúde

ORF - *Open Reading Frame*

P53 – Proteína de Tumor

PBS – Tampão fosfato-salino

pH – Potencial Hidrogeniônico

PHEIC – Emergência de Saúde Pública Internacional (sigla em inglês)

prM – Proteína Precursora de Membrana

PRR – Receptor Reconhecedor de Padrão

RIG-I – Receptor de ácido retinóico I

RN – Rio Grande do Norte

RNA – Ácido Ribonucleico

RNA-seq – Sequenciamento de RNA

ROS – Espécies reativas de oxigênio

rRNA – RNA ribossômico

RT-PCR - Reação da Transcriptase Reversa seguida pela Reação em Cadeia da Polimerase

SAM – *Sequence Alignment Map*

SCZ – Síndrome Congênita do Zika

SFB – Soro fetal bovino

SGB – Síndrome de Guillain-Barré

SNC – Sistema Nervoso Central

SNP – Polimorfismo de nucleotídeo único

TAM – Subfamília de proteínas tirosina quinase composta por três componentes: Tyro3, Axl e MerTk

TIM-1 – *T-cell Immunoglobulin and Mucin domain 1*

TLR – Receptores do tipo Toll

TMM - *Trimmed Mean of M-values*

TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa

Tyro3 – Receptor tirosina-proteína-quinase

UFP – Unidades Formadoras de Placa

Wnt – Via de Transdução Wnt

WNV – Vírus do Nilo Ocidental

YFV – Vírus da Febre Amarela

ZIKV – *Zika virus*

ZO-1 – *Tight junction protein 1*

Z-RNA – Conformação alternativa canhota para a dupla hélice de RNA

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e Panorama Atual do Zika Virus.....	19
1.2 Zika Vírus.....	23
1.3 Consequências da Infecção por Zika Virus.....	27
1.4 Patogênese.....	30
1.5 RNA-Seq e Análise de Transcriptoma.....	33

2.0 JUSTIFICATIVA.....37

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral.....	38
3.2 Objetivos Específicos.....	38

4.0 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Ética em Experimentação Animal.....	39
4.2 Vírus, Cultura Celular e Anticorpos.....	39
4.3 Animais e Protocolos Experimentais.....	39
4.4 Extração de RNA total e Sequenciamento (RNA-Seq).....	41
4.5 Análise de Bioinformática e Análise Estatística.....	42
4.5.1 Controle de Qualidade.....	42
4.5.2 Alinhamento.....	42
4.5.3 Sumarização e Quantificação.....	42
4.5.4 Normalização e Análise de Expressão Diferencial.....	43
4.5.5 Análise de Enriquecimento de Genes Sets.....	43
4.5.6 Figuras e Gráficos.....	43

5.0 RESULTADOS

5.1 Métricas do Sequenciamento.....	44
5.2 Expressão Diferencial entre os Grupos Experimentais.....	44
5.3 Análise de Expressão Diferencial por Volcano plot.....	47
5.4 Análise Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos.....	49
5.5 Enriquecimento de Vias.....	52
5.6 Análise de Enriquecimento do Conjunto Genético.....	58
5.7 Análise de <i>Splicing</i> Alternativo.....	62

6.0 DISCUSSÃO.....71

7.0 CONCLUSÃO.....	84
REFERÊNCIAS.....	85
ANEXOS	
Anexo A.....	104
Anexo B.....	110

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Histórico e Panorama Atual do Zika Vírus

Os flavivírus sempre causaram epidemias em diversas regiões do mundo. Geralmente estão associados a vetores como mosquitos e carrapatos que se sobrepuseram e fizeram com que vários flavivírus co-circulassem em diferentes locais que possuem como facilitador a disponibilidade de recursos para a multiplicação desses artrópodes (Sariol *et al.*, 2018; Hassert *et al.*, 2019). O vírus da Zika (ZIKV) é um desses flavivírus circulantes em diversas regiões do mundo (Gordon *et al.*, 2019).

O ZIKV foi identificado pela primeira vez em 1947 no sangue de um macaco rhesus sentinela em um estudo de investigação do vírus da Febre Amarela (YFV), na Floresta de Zika na Uganda (Dick *et al.*, 1952). Mas acredita-se que esse vírus tenha evoluído na década de 20, após vários eventos de recombinação relacionados a perdas e ganhos do sítio de N-glicosilação da proteína E (Faye *et al.*, 2014). Além disso, é possível que o ZIKV tenha circulado no sudeste asiático desde 1950, porém como não havia casos de infecção em humanos não houve tanta preocupação com esse vírus (Pettersson *et al.*; 2018).

Em 1948, o vírus foi isolado pela primeira vez a partir de uma espécie de mosquitos do gênero *Aedes* (Dick, 1953). Essa descoberta não foi suficiente para determinar que esse fosse o vetor de ZIKV e somente em 1956 essa afirmação pôde ser feita (Boorman e Porterfield, 1956; Sampaio *et al.*, 2019). Foi em Uganda, no continente Africano, em 1952, que provavelmente ocorreu a primeira infecção humana por esse vírus, identificada através de anticorpos neutralizantes anti-ZIKV presentes no soro do paciente infectado. Nos primeiros casos, a icterícia foi observada como principal sinal clínico e constatado a afinidade do vírus por progenitores neurais, após observar alterações neurológicas em camundongos infectados pelo vírus (Regan e Brueckner, 1953; Sampaio *et al.*, 2019). Na década de 60 foi observada a co-circulação de ZIKV e de YFV na Etiópia, sendo observado também que os anticorpos associados à ZIKV exacerbam a infecção por YFV (Sérié *et al.*, 1968).

Anteriormente ao ano de 2007, o ZIKV circulava em diversos lugares principalmente da Ásia e África, mas de forma silenciosa e com pouco impacto na saúde pública. No primeiro semestre do ano citado ocorreu uma grande epidemia do

vírus na Ilha de Yap, na Micronésia. A incidência de infecção foi de aproximadamente 74%, mas apenas 20% dos casos foram sintomáticos, com os pacientes apresentando principalmente dores nas articulações, conjuntivite e exantema (Lanciotti *et al.*, 2008). Até essa epidemia, acreditava-se que o vírus era transmitido apenas pela picada de mosquitos do gênero *Aedes* (Duffy *et al.*, 2009). Mas em 2008, foi constatado em Senegal, que a infecção poderia ocorrer por via sexual (Foy *et al.*, 2011). Após isso, vários estudos também mostraram a possibilidade de transmissão vertical, incluindo a via placentária e perinatal (Frank *et al.*, 2016). Em 2013 ocorreu outra grande epidemia de ZIKV que atingiu 30 mil pessoas na Polinésia Francesa, onde foi observada a relação da infecção viral com a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Cao-Lormeau *et al.*, 2014). O vírus responsável por essa epidemia sofreu mutações no gene de envelope que resultou em um aumento de sua transmissibilidade via vetorial, em relação ao vírus responsável pela epidemia de 2007 (Calvet *et al.*, 2016).

Segundo Possas (2016), o ZIKV está dividido em dois sorotipos: africano e asiático, sendo esse último o sorotipo circulante nas Américas. Além disso, a entrada do vírus no Brasil pode ter ocorrido no segundo semestre em 2013, porém não houve casos notificados (Possas, 2016). O primeiro caso de infecção foi registrado em 2015 (Faria *et al.*, 2016). A linhagem asiática foi responsável pela maioria dos surtos de ZIKV como os ocorridos no Pacífico e nas Américas desde 2007, porém, a linhagem africana é capaz de causar uma infecção mais robusta tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Freire *et al.*, 2015). No entanto, as razões pelo qual essa linhagem não foi difundida e responsável pelos surtos como a asiática são complexas e multifatoriais, podendo estar relacionado com proteção heterotípica cruzada, devido à prévia infecção por outros flavivírus, ou com a melhor adaptação da linhagem asiática ao hospedeiro (Liu *et al.*; 2019a).

Dessa forma, em maio de 2015, o vírus foi identificado pela primeira vez no continente americano, sendo originário da amostra que causou a epidemia na Polinésia Francesa (Naccache *et al.*, 2016). Foram levantadas algumas hipóteses de como o vírus chegou à América do Sul, especificamente no Brasil. A primeira hipótese é de que o vírus foi introduzido no território brasileiro durante a Copa do Mundo de Futebol de 2014, através de turistas ou seleções participantes (Zanluca *et al.*, 2015). A segunda possibilidade estaria vinculada ao Campeonato Mundial de Canoagem que ocorreu no Rio de Janeiro em 2014 e a terceira está relacionada à

Copa das Confederações em 2013 (Musso *et al.*, 2015). Já a quarta hipótese sugere que o vírus teria sido introduzido pela Ilha de Páscoa, após circulação na Oceania. Dessa forma, a introdução do vírus teria ocorrido pela América Central e Caribe e foi se disseminando até chegar ao Brasil. Essa hipótese foi proposta porque os casos identificados no país revelaram um genótipo viral com ancestral comum provindo do Caribe (Faria *et al.*, 2016). Porém, a rota contrária do vírus também foi observada, sendo proveniente do território brasileiro e se disseminando para a América do Sul e Central (Campos *et al.*, 2018). Considerando o estudo de Campos e colaboradores (2018), a rota de chegada do ZIKV no Brasil se assemelha com a rota de introdução de outros arbovírus, sendo que no caso de ZIKV, esse vírus teria chegado no território brasileiro no final de 2013 por meio de imigrantes ilegais vindos do Haiti e militares brasileiros que viajaram para esse país.

Em 2014, pacientes com sintomas semelhantes à infecção por ZIKV foram identificados em municípios do Nordeste brasileiro. Mas devido à co-circulação de outros arbovírus e a precariedade no diagnóstico clínico, esses casos não foram considerados inicialmente casos de infecção por ZIKV. Um aumento de casos de SGB também foi observado (Vargas *et al.*, 2016). Em 2015, o Ministério da Saúde notificou muitos casos de microcefalia na região Nordeste enquanto a região passava por uma epidemia de ZIKV, por isso, os casos de microcefalia foram associados com a infecção viral (Brasil, 2015). Mlakar e colaboradores (2016) mostraram que há relação causal da infecção congênita por ZIKV e microcefalia, após detecção do vírus no tecido cerebral do feto, que teve a gestação interrompida após detecção da microcefalia. Neste caso, a mãe foi infectada pelo vírus durante a gravidez enquanto fazia trabalho voluntário em Natal (RN, Brasil) (Mlakar *et al.*, 2016). Posteriormente em 2016, a OMS declarou Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional (PHEIC) com os casos de infecção por ZIKV e as consequências associadas, deixando a população em alerta, sobretudo as gestantes (WHO, 2016a).

O Nordeste do Brasil foi a região mais afetada durante a epidemia, onde 93,6% dos registros de microcefalia associada a ZIKV foram notificados entre outubro de 2015 e dezembro de 2016 (Possas *et al.*, 2017). Ainda hoje, essa região continua sendo a que apresenta maior número de casos, com destaque para os estados de Pernambuco e Bahia, seguido da região Sudeste e Centro-Oeste, principalmente no estado de São Paulo (Brasil, 2019). O clima nordestino é um fator

potencializador, pois esse permite a reprodução eficaz e rápida do vetor (Liu *et al.*, 2019a).

Os números de casos de infecções por ZIKV diminuíram muito na América Latina, comparado ao pico da epidemia em 2015 e 2016 (Sampaio *et al.*, 2019). Até janeiro de 2018, foram registrados aproximadamente 3700 casos de alterações congênitas associadas à infecção por ZIKV no continente americano (Musso *et al.*, 2018). Em 2019, 393 possíveis casos de infecção por esse vírus em gestantes foram registrados no Brasil, sendo que 59 foram confirmados (Brasil, 2019). Desde a semana epidemiológica 45 do ano de 2015 até maio de 2020 foram notificados aproximadamente 19072 casos prováveis de infecção por ZIKV no Brasil, dos quais 3535 foram confirmados, sendo predominante na região Nordeste (Figura 1A) (Brasil, 2020). De acordo com dados do Ministério da Saúde (2020), apenas em 2020, foram notificados 468 novos casos, sendo 13 confirmados e não sendo identificados casos de óbitos até a semana epidemiológica 26, referente ao mês de Julho de 2020 (Figura 1B). O declínio dos casos pode estar relacionado à aquisição de imunidade contra o ZIKV devido ao contato assintomático com esse vírus (Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2019). Outro fator é a sazonalidade que afeta a biologia dos vetores, diminuindo o número de infecções em estações do ano em que naturalmente há menor número de mosquitos (Strottmann *et al.*, 2019).

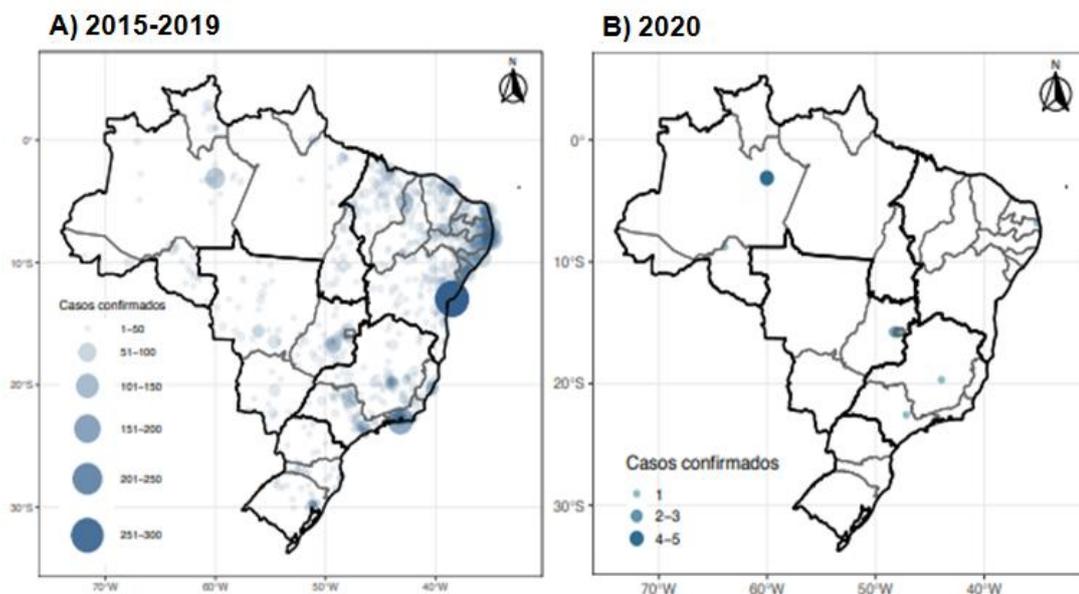


Figura 1: Distribuição de casos confirmados de infecção por ZIKV entre 2015 e 2020. Mapa da distribuição de casos confirmados de infecção por ZIKV, por região e ano epidemiológico de notificação no Brasil entre 2015 e a semana epidemiológica 26 de 2020. Regiões com cores mais escuras e esferas maiores representam os estados brasileiros que mais foram infectados por ZIKV.

Mapa da esquerda representa a situação epidemiológica para o vírus entre o surto de 2015 e o ano de 2019. O mapa da direita apresenta os dados confirmados de infecção por ZIKV até a semana epidemiológica 26 do ano de 2020. Adaptado de: Ministério da Saúde, Brasil (2020).

Mesmo com a diminuição dos casos de ZIKV e das consequências do vírus, ainda ocorrem alguns casos de infecção em humanos (Carvalho, 2016), evidenciando a possibilidade de novas epidemias, principalmente quando se observa epidemias recorrentes de outros flavivírus como os vírus da Dengue (DENV) e YFV (WHO, 2019). No entanto, essa possibilidade não é tratada com tanta ênfase como em 2015, pois a Zika não é mais considerada caso de emergência na saúde pública (Strottmann *et al.*, 2019). Contudo, o estudo de Brady e Hay (2019) indica que o vírus continua circulando em países afetados e não afetados anteriormente, como na Europa, onde foi detectada a presença do vírus nos vetores, principalmente em *Aedes albopictus* e a reprodução vetorial.

Esse cenário também afeta o comportamento humano, pois, no Brasil, por exemplo, a taxa de crianças nascidas vivas desde 2015 diminuiu comparada aos anos antecedentes quando o ZIKV não era uma epidemia no país (Hamad, 2019). Segundo o IBGE (2019), no início da epidemia de ZIKV em 2015 o número de nascidos por ano era de aproximadamente 3 milhões de crianças, enquanto, em 2017 o número reduziu para aproximadamente 2 milhões e 800 mil nascidos. Esses dados podem estar relacionados ao receio de muitas mulheres em engravidar, já que através da transmissão vertical muitos recém-nascidos foram infectados pelo vírus e apresentaram sinais clínicos relacionados ao ZIKV (Hamad, 2019). Além disso, a infecção por ZIKV pode desencadear complicações neurológicas no indivíduo durante a fase adulta, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), comprometendo as funções do sistema nervoso do paciente infectado (Mallet *et al.*, 2015).

1.2 Zika Vírus

O ZIKV é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, que abrange também o vírus da Dengue (DENV) e o YFV, ambos endêmicos no território brasileiro, como também o vírus do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da Encefalite Japonesa (JEV), endêmicos em outras regiões do mundo (Ropidi *et al.*, 2020). A maioria dos flavivírus possui como vetor um artrópode, sendo mais comum mosquitos e carrapatos. Na infecção por ZIKV, a transmissão está comumente

relacionada à picada de fêmeas do mosquito do gênero *Aedes* (Onyango *et al.*, 2020). Porém, conforme descrito anteriormente, outras formas de transmissão foram demonstradas, como a transmissão vertical por via placentária, perinatal ou sexual (Basu e Tumban, 2016; Olson *et al.*, 2016).

As partículas virais de ZIKV possuem cerca de 42 a 52 nm de diâmetro e apresentam formato esférico e simetria icosaédrica. O genoma do ZIKV caracteriza-se por uma cadeia simples de RNA senso positivo com aproximadamente 10,8 kb de comprimento. A tradução do seu genoma resulta em uma única poliproteína, que é clivada posteriormente por proteases virais ou do hospedeiro, formando dez proteínas, sendo três estruturais (C, prM, E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (Figura 2) (Rombi *et al.*, 2020). Além disso, no ZIKV existem regiões não codificadas nas extremidades 5' e 3', que possuem papel importante na replicação viral e levam a formação de um RNA subgenômico que atua no controle da atividade viral inibindo o receptor de ácido retinóico I (RIG-I) do hospedeiro, o que interfere na produção de interferons (Manokaran *et al.*, 2015). O nucleocapsídeo do vírus é formado pela proteína C associada ao RNA e o envelope é constituído por uma bicamada lipídica com unidades das glicoproteínas E e M (Sirohi *et al.*, 2016).

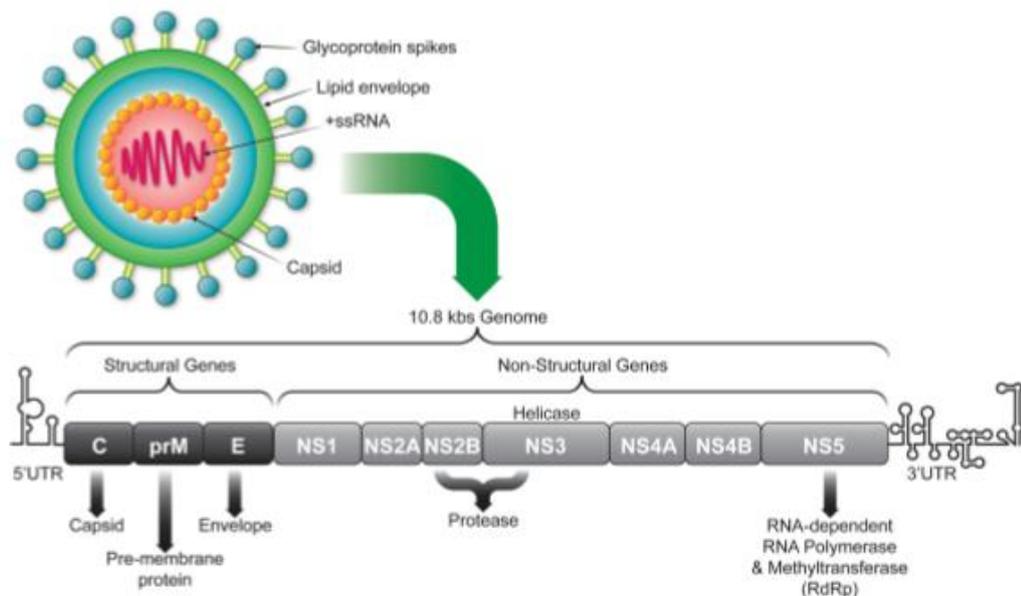


Figura 2: Representação do genoma do ZIKV e as proteínas codificadas. O genoma do ZIKV possui aproximadamente 10,8kb de comprimento e codifica três proteínas estruturais (capsídeo (C), precursor de membrana (prM), envelope (E)) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5). Fonte: Rombi *et al.*, 2020.

No repasto sanguíneo, o vírus é depositado na derme ou epiderme do hospedeiro, infectando primeiramente fibroblastos da derme, queratinócitos da epiderme e células dendríticas imaturas. Nesse tecido, o ZIKV promove a ativação de diversos receptores de reconhecimento de padrão (PRR), como os receptores do tipo Toll (TLRs), gene induzível por ácido retinoico (RIG-I), gene associado à diferenciação de melanoma (MDA-5) e também genes de atividade imune antiviral, desencadeando a produção de interferons (Hamel *et al.*, 2015).

Após a infecção, há inicialmente uma fraca interação entre a partícula viral e a célula hospedeira, mas os inúmeros receptores de entrada aumentam essa interação, tornando-a forte e efetivando a ligação do vírus à célula hospedeira (Agreli *et al.*, 2019). O vírus penetra na célula do hospedeiro via endocítica mediada por clatrina, ocorrendo uma mudança conformacional no envelope, fusão de membranas e liberação do material genético viral no interior da célula. Essa penetração é mediada pela interação de N-glicanos conjugada a proteína E do ZIKV, que contém três domínios e um sítio de glicosilação (Figura 3) (Sirohi *et al.*, 2016). Segundo Meertens e colaboradores (2017), o AXL, receptor tirosina quinase da família TAM (Tyro3, Axl e Mer), pode ser um dos principais receptores que facilitam e permitem a entrada do vírus nas células neurais, principalmente células da glia e astrócitos. Além disso, esse receptor pode ser capaz de induzir a sinalização de interferon, modulando a resposta imune inata (Meertens *et al.*, 2017).

O vírus é capaz de alcançar outros órgãos como coração, fígado, músculos esqueléticos, olhos, sistema reprodutor feminino e masculino, feto e placenta (em casos de mulheres grávidas) e principalmente o sistema nervoso central (Melo *et al.*, 2016; Ferreira *et al.*, 2018; Santana *et al.*, 2019). O neurotropismo é uma característica importante do vírus, que o permite infectar muitas células como astrócitos, macrófagos, trofoblastos, células da glia, da micróglia e células endoteliais (Miner *et al.*, 2016; Lum *et al.*, 2017; Huang *et al.*, 2018).

A montagem das partículas virais acontece associada ao retículo endoplasmático, onde ocorre a síntese de proteínas estruturais e, maturado no complexo de Golgi, pois depende do pH ácido da rede trans-Golgi para finalização desse processo (Figura 3) (Heinz e Stiasny, 2006; Cortese *et al.*, 2017). Durante a montagem da partícula viral o pH da rede trans-Golgi induz a reorganização de prM-E, que permite a exposição do local de clivagem de prM (Heinz e Stiasny, 2012). Dessa forma, prM é clivado por furina e permanece associado a partícula viral até a

liberação. Na liberação, o peptídeo “pr” se dissocia devido ao pH neutro do meio extracelular (Agreli *et al.*, 2019).

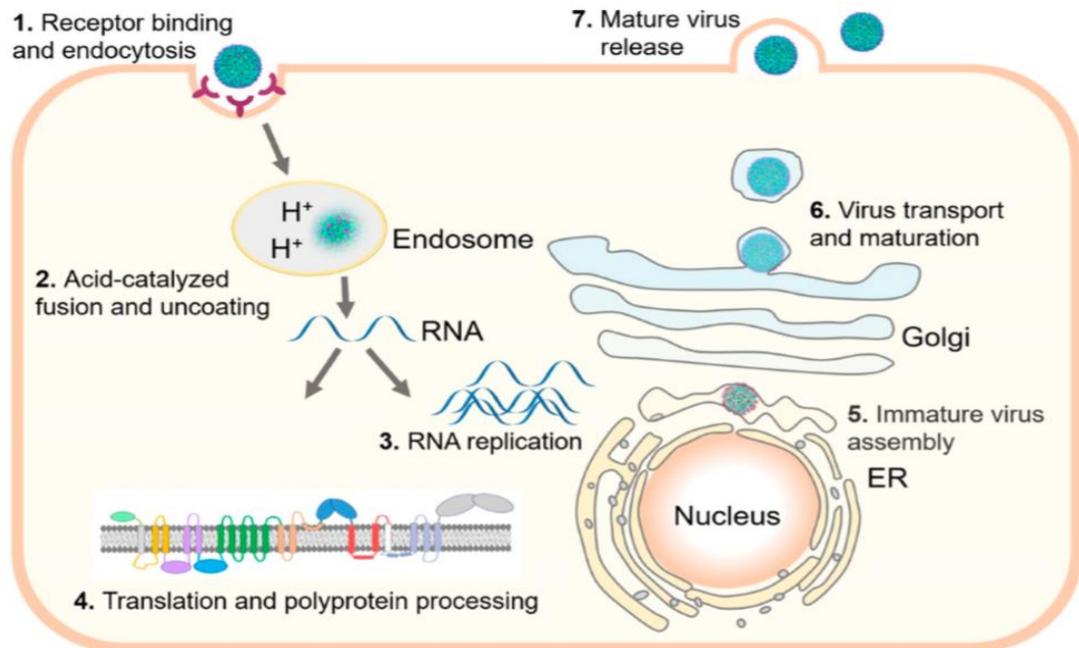


Figura 3: Ciclo de Multiplicação do ZIKV. Esquema demonstra o ciclo de multiplicação do ZIKV após penetração na célula hospedeira até o momento de liberação. Fonte: Hu e Sun, 2019.

Na fase aguda da infecção observa-se uma alta produção de citocinas, principalmente TNF, IL-1b, IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, em resposta a ativação de células T policlonais, enquanto que na fase de recuperação há o aumento de IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, bem como a estimulação da produção de granulócitos e macrófagos (Tappe *et al.*, 2016; Kam *et al.*, 2017; Naveca *et al.*, 2018). Algumas citocinas (TNF, IL-1 β e IL-6) podem induzir a expressão de colesterol 25 hidroxilase (CH25H), uma proteína com efeito antiviral, relacionada com implicações nas células do sistema nervoso central, decorrente da infecção por ZIKV (Magoro *et al.*, 2019). Portanto, observa-se que as citocinas e quimiocinas possuem papel importante na sinalização e ativação da resposta imune, auxiliando na recuperação do organismo do indivíduo infectado por ZIKV (Kwock *et al.*, 2020). Entretanto, no contexto gestacional a ativação imune materna (AIM) pode promover uma resposta inflamatória exacerbada na infecção por ZIKV, podendo afetar o desenvolvimento fetal (Estes e Mcallister, 2016). Nessas condições ocorre a liberação de glicocorticoides, citocinas pró-inflamatórias e TNF que provém da mãe e do feto, sendo que no contexto da infecção as células do trofoblasto são as maiores

produtoras de mediadores inflamatórios que agem no feto, afetando principalmente o sistema nervoso (Meyer *et al.*, 2008; Estes e Mcallister, 2016).

1.3 Consequências da Infecção por Zika Vírus

O período de incubação do ZIKV dura aproximadamente de três a doze dias e quando ocorre a manifestação dos sintomas, esses podem durar de três a sete dias (Valle *et al.*, 2016). A maioria das pessoas infectadas não apresentam sintomas clínicos, sendo que apenas cerca de 20 a 25% dos infectados apresentam sinais clínicos e podem desenvolver a doença com quadros clínicos de leves a graves (Song *et al.*, 2017). Os sintomas não são todos recorrentes na infecção, podendo se manifestar de diversas formas de acordo com o organismo (Thomas *et al.*, 2016). Os principais sintomas e sinais clínicos são: febre aguda entre 37,8°C e 38,5°C, exantema maculopapular, mialgia, dor de cabeça, conjuntivite, uveíte, tosse, vômito, dor de garganta, dor retro orbitária, artralgia, artrite e edema nos membros inferiores. Foram observados também em alguns pacientes de forma menos frequente hematospermia, hipoacusia, trombocitopenia e petéquias. Grande parte dos sintomas/sinais clínicos desaparece em sete dias, todavia, a artralgia pode permanecer por cerca de um mês (Thomas *et al.*, 2016; Song, *et al.*, 2017; Martins *et al.*, 2020).

Em comparação a outras doenças causadas por flavivírus, como a dengue, a febre do ZIKV possui sintomas semelhantes, mas não apresenta quadros de hemorragia (Eduvirgem *et al.*, 2018). Em contrapartida a principal complicação está relacionada a anormalidades neurológicas em crianças recém-nascidas, na qual ocorreu a infecção da mãe durante a gestação (Valle *et al.*, 2016). No surto de ZIKV no Brasil em 2015, foi observado o aumento de número de complicações neurológicas como a microcefalia e a SGB (Kwong *et al.*, 2013; WHO, 2016b).

Em adultos, destaca-se a SGB como principal consequência neurológica e está relacionada à infecção prévia por outros arbovírus além de ZIKV, como DENV e Vírus Chikungunya (CHIKV) (Song *et al.*, 2017). É caracterizada por uma doença neuromuscular, autoimune, desmielinizante, monofásica, mediada por anticorpos que leva o sistema imunológico do paciente afetar o sistema nervoso periférico (Nagarajan *et al.*, 2016). Os sintomas manifestam-se em uma ou duas semanas, sendo o primeiro deles na maioria dos casos a parestesia (Wijdicks e Klein, 2017). Além desse, observa-se paralisia flácida e fraqueza muscular acompanhada de

depressão e ausência de reflexos nos tendões (Cao-Lormeau *et al*, 2016). Também leva a paralisia dos membros, músculos faciais e orofaríngeos, podendo levar o paciente a morte devido à desmielinização das fibras nervosas que controlam a musculatura respiratória (Wijdicks e Klein, 2017).

A microcefalia associada à infecção por ZIKV é uma das principais complicações neurológicas graves em recém-nascidos. Isso foi observado inicialmente quando mães foram infectadas no primeiro trimestre de gestação, infectando o feto possivelmente pela transmissão vertical via placentária (Gilbert-Jaramillo *et al.*, 2019). Ao nascer, foram observados nessas crianças redução do neurodesenvolvimento, morte neuronal, desregulação de apoptose e neurogênese (Cugola *et al.*, 2016). A microcefalia pode ser causada por múltiplos fatores entre eles condições genéticas, desnutrição materna, uso de álcool e drogas pela mãe, exposição à radiação, diabetes materna não controlada e infecções durante a gravidez (Dantas *et al.*, 2019; Brasil, 2015). Na infecção por ZIKV, a redução cerebral pode estar associada ao comprometimento energético durante o neurodesenvolvimento, onde não há a expressão de receptores de glicose devido a infecção viral, restringindo o desenvolvimento e funcionamento do órgão (Hofmann *et al.*, 2017).

Segundo Portela e colaboradores (2020), a microcefalia é uma condição onde o crânio do bebê ao nascer é menor ou igual a 33 cm. Os recém-nascidos com microcefalia apresentam irritabilidade, anormalidades auditivas e visuais, tremores e convulsões (WHO, 2016c). Em exames de imagem é possível observar calcificações, hipoplasia do tronco cerebral e do cerebelo e ventriculomegalia (Mlakar *et Li.*, 2016). Nesse quadro, observa-se a presença do vírus na placenta, tecidos fetais como cório e alantoide, líquido amniótico, fígado e rins de recém-nascidos, partículas virais e antígenos virais no tecido cerebral e também IgM anti-ZIKV no líquido amniótico (Wiley e Chimelli, 2017). Essas e outras alterações observadas no feto podem ser acarretadas devido à ativação do sistema imune materno (AIM), sendo que de acordo com o grau de infecção por ZIKV, a AIM pode agravar as consequências no neurodesenvolvimento fetal (Estes e Mcallister, 2016).

A Síndrome Congênita do Zika (SCZ) passou a ser usada como definição para um conjunto de anomalias fetais a partir do momento em que foi observado que crianças nascidas de mães infectadas por ZIKV apresentavam além de microcefalia, outras manifestações clínicas como alterações oculares, desproporção craniofacial,

deformidades articulares e de membros, além de morte fetal (Melo *et al.*, 2016). A microcefalia é uma das alterações congênitas mais graves, mas não é determinante na condição da SCZ (Fnui, 2018). O sistema nervoso central é um dos sistemas mais comprometidos na SCZ, sendo as principais características a redução do volume cerebral, malformações do desenvolvimento cortical, ventriculomegalia, calcificações nos gânglios da base, disgenesia e hipoplasia em estruturas como cerebelo, ponte e tronco cerebral (Mlakar *et al.*, 2016). Em relação às manifestações comportamentais de uma criança afetada pela SCZ, está a irritabilidade, hiperreflexão, choro excessivo, convulsões, crises epiléticas, além de apresentarem problemas na fala, deglutição, visão e audição (Melo *et al.*, 2019). Também são observados comportamentos associados a esquizofrenia, autismo, déficit de atenção e dificuldades de socialização (Smith *et al.*, 2007; Deslauriers *et al.*, 2016).

A manifestação dessas alterações comportamentais ocorre tardiamente, quando o bebê inicia o desenvolvimento motor a partir dos 6 meses de idade (Carvalho *et al.*, 2017). O estudo de Figueiredo e colaboradores (2019) em camundongos sugere que a infecção por ZIKV reduz a quantidade de sinapses e causa disfunção na memória. Todavia, as complicações neurológicas em camundongos adultos imunocompetentes, como comprometimento da memória e inibição do hipocampo, além das demais complicações já relatadas, podem estar vinculadas à produção aberrante de TNF- α , ativação da microglia e do sistema do complemento, comprometendo a atividade do hipocampo e funcionamento da memória agravando os distúrbios neurológicos causados pela infecção (Figueiredo *et al.*, 2019). Além disso, Li e colaboradores (2016a) demonstraram que o ZIKV atinge células-tronco neurais, tanto em cérebros adultos como em cérebros em formação, provocando morte dessas células. Conduzido com camundongos deficientes, o estudo mostrou a vulnerabilidade do sistema nervoso diante a infecção por ZIKV, após o vírus ser inoculado no sangue do hospedeiro (Li *et al.*, 2016b).

O desenvolvimento de alterações neurológicas depende da capacidade da neurovirulência e neuroinvasão do vírus (Mlakar *et al.*, 2016). A forma como o ZIKV induz a microcefalia está relacionada com a predileção do vírus para os progenitores neurais (Gladwyn-NG *et al.*, 2018). Após a transmissão via placentária, o receptor AXL facilita a propagação do vírus em células progenitoras neurais humanas, fazendo com que ocorra a sinalização e ativação da resposta imune das células infectadas (Nowakowski *et al.*, 2016). Além do AXL, fatores de entrada e/ou adesão

facilitam a entrada e multiplicação do vírus na célula, como DC-SIGN, Tyro3, TIM-1 e TAM AXL (Hamel *et al.*, 2015). A neurogênese é afetada reduzindo sua atividade, enquanto que a apoptose aumentada leva à parada do ciclo celular e morte dos neurônios (Faizan *et al.*, 2016; Li *et al.*, 2016b).

A SCZ pode estar relacionada também com a resposta diferencial produzida pelo vírus nas células tronco neurais do cérebro do feto, onde há o aumento da morte celular e desregulação da função do tecido (Beys-da-Silva *et al.*, 2019). De acordo com Chiu e colaboradores (2020) outro fator relevante é o aumento da permeabilidade de células do sistema nervoso central durante a infecção e rompimento da barreira hematoencefálica que o vírus induz através da degradação de ZO-1 (*tight junction protein 1*) e de ocludina que interrompe as junções celulares das células de barreira. Desse modo a incidência de distúrbios neurológicos no feto é agravada (Chiu *et al.*, 2020).

1.4 Patogênese

A infecção por ZIKV acarreta em um quadro de febre aguda e situação autolimitante para o paciente (Song *et al.*, 2017). Semelhantemente à infecção por outros flavivírus, como DENV, possivelmente, o vírus infecta as glândulas salivares e epiteliais do mosquito vetor do gênero *Aedes*, após ingestão de sangue contaminado, sendo encontrado na saliva do inseto em um período de 5 a 10 dias após a infecção (Wong *et al.*, 2013). No repasto sanguíneo, a saliva infectada é depositada na derme e epiderme do hospedeiro, acarretando na infecção de fibroblastos e queratinócitos (Hamel *et al.*, 2015).

A infecção inicial em células epiteliais pode permitir que o ZIKV chegue aos gânglios linfáticos facilmente, atingindo os vasos sanguíneos e sendo transportado para outros tecidos, como o sistema nervoso central (SNC) (Meertens *et al.*, 2017). A viabilidade do vírus na célula hospedeira pode estar relacionada à ativação de vias de TLR3 e autofagia, induzida pelo ZIKV após a entrada e replicação do microrganismo (Ojha *et al.*, 2018). A infecção favorece o aumento da expressão de genes de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e o gene RIG-I, associados com a detecção de padrões moleculares associados a microrganismos (MAMPs) (Hamel *et al.*, 2015). Além disso, o ZIKV estimula a expressão de genes associados à IFNs e quimiocinas, como também a ativação da proteína P53, relacionada à morte celular por apoptose e estresse genotóxico (Beltrame *et al.*,

2018). Essa proteína induz apoptose em células que expressam antígenos virais, o que resulta na perda de neurônios e agravamento dos danos neurológicos causados por ZIKV, sendo também importante na propagação viral (Ghouzzi *et al.*, 2016).

O ZIKV atinge gravemente o SNC, mas pode se disseminar para outros órgãos, como olhos, testículos, ovários, útero, tecidos esqueléticos, miocárdio e feto em caso de mulheres grávidas (Miner e Diamond, 2017). O vírus também infecta células progenitoras neurais que provêm de células tronco pluripotentes (Tang *et al.*, 2016). O estudo de Garcez e colaboradores (2016) demonstra a capacidade de ZIKV de prejudicar a formação de neuroesferas e na neurogênese, em estudos *in vitro*. Contudo, Liang e colaboradores (2016) reafirma a interferência do vírus na neurogênese e aponta a inibição da via Akt-mTOR, que possui papel importante no crescimento e diferenciação celular, na formação do sistema nervoso e no controle da autofagia. Alterações nessa via podem acometer o SNC e ocasionar distúrbios neurológicos, como a microcefalia (Liang *et al.*, 2016).

O neurotropismo do vírus pode estar associado à expressão do receptor AXL nas células neurais (Meertens *et al.*, 2017). Isso pode contribuir para o desenvolvimento de patologias neurológicas, já que são observados em células da glia, endoteliais, astrócitos, microglia do córtex em desenvolvimento, além de ser encontrado também em células da retina (Nowakowski *et al.*, 2016). Assim, de acordo com Meertens e colaboradores (2017), esse receptor é um facilitador da entrada do ZIKV nas células neurais, bem como receptores de lectina do tipo C e receptores de fosfatidilserina, como os da família TAM e TIM, que também contribuem para a infecção viral.

Mulheres infectadas por ZIKV, principalmente no primeiro trimestre de gestação, podem gerar crianças com anormalidades congênitas, como a microcefalia (Sheridan *et al.*, 2017). A presença de RNA viral no líquido amniótico, placenta e útero dessas mulheres indicam neurotropismo do ZIKV para esses órgãos (Mlakar *et al.*, 2016). De acordo com Proença-Modena e colaboradores (2018), a infecção o neurotropismo do vírus na infecção vertical pode estar relacionado à transcitose do ZIKV através da placenta ou a própria infecção placentária. Isso levaria a disseminação do vírus no sistema nervoso do feto, infectando principalmente o cérebro, tendo em vista que a resposta inflamatória resultante da infecção viral altera o desenvolvimento neural (Proença-Modena *et al.*, 2018).

Na infecção placentária, os macrófagos e sinciotrofoblastos são as células mais permissivas à infecção, podendo estar relacionado à via de sinalização JAK-STAT, pois o bloqueio dessa via aumenta a replicação viral (Quicke *et al.*, 2016; Gavegnano *et al.*, 2017). Contudo, Sheridan e colaboradores (2017) sugerem que a placenta e as células placentárias oferecem um ambiente propício à multiplicação viral, pois as células do órgão produzem proteínas que favorecem a entrada do vírus nas células fetais. Dessa forma, o feto fica vulnerável à infecção, pois ainda não possui resposta imunológica capaz de combater o vírus, sendo, portanto, facilmente infectado (Sheridan *et al.*, 2017). Essa infecção é mais efetiva no primeiro semestre de gestação, porém, estudos como de Soares de Souza e colaboradores (2016), demonstram que a síndrome congênita do Zika pode gerar danos no feto na infecção em qualquer momento da gestação.

Foi observada a exacerbação das manifestações clínicas da SCZ em regiões endêmicas para outros flavivírus, como DENV durante o surto de ZIKV em 2015, sendo possível que o agravamento das consequências da infecção materna por ZIKV esteja associado a infecção prévia por sorotipos de DENV (Petzold *et al.*, 2021). O ZIKV possui semelhanças filogenéticas com DENV, considerando que países tropicais, como o Brasil são endêmicos para esse patógeno (Bardina *et al.*, 2017). Devido a isso, pacientes previamente infectados por DENV podem apresentar produção de anticorpos por reatividade cruzada através do fenômeno de ADE (*Antibody-Dependent Enhancement*) (Dejnirattisai *et al.*, 2016). Esse fenômeno ocorre quando anticorpos com reatividade cruzada que agem nas proteínas de pré-membrana e do envelope viral para um vírus, facilita a ligação de complexos imunes secundários, o que colabora com o transporte do vírus pelas membranas células gerando o aumento da replicação viral (Bonheur *et al.*, 2021). Assim, essa interação gera um aumento de células infectadas e uma resposta inflamatória exarcebada (Guzman *et al.*, 2013). Estudos *in vivo* demonstram que anticorpos anti-DENV produzem ADE na infecção por ZIKV, sendo pouco neutralizantes. Já *in vitro*, a ADE produzida a partir da reatividade cruzada na infecção por DENV, é verificado o aumento da infecção por ZIKV, principalmente devido a receptores Fc de IgG (Bardina *et al.*, 2017). Zimmerman e colaboradores (2018) descrevem em modelo *in vitro* que anticorpos específicos para DENV são capazes de aumentar a infecção por ZIKV em macrófagos da placenta por meio da facilitação de entrada do vírus na

célula hospedeira conferido pelo complexo ZIKV-anti-DENV, sugerindo interferência dos anticorpos anti-DENV na transmissão vertical por ZIKV.

1.5 RNA-Seq e Análise de Transcriptoma

A biologia molecular vem se esforçando desde a década de 1950 para aprimorar as técnicas de sequenciamento, mas foi em 1975 que essa área de conhecimento começou a crescer, após a descrição da técnica por Frederick Sanger (Stroher, 2018). A técnica desenvolvida ficou conhecida como Sequenciamento Gênico Sanger e é baseada no uso de sequências iniciadoras de nucleotídeos, que se anela com a sequência que está em estudo onde, posteriormente com o auxílio de uma DNA polimerase é iniciado o processo de replicação do DNA (Sanger *et al.*, 1977). Essa técnica permite sequenciar aproximadamente de 400 à 700 pares de base de uma região alvo e o primeiro genoma a ser sequenciado foi do fago phi X17 (Sanger *et al.*, 1977).

O sequenciamento de Sanger se tornou uma técnica muito usada, mas apesar de ter permitido o sequenciamento genômico, possuía limitações no diagnóstico de doenças genéticas, onde as mutações do gene ocorrem em regiões de “hot spot” (Liu *et al.*, 2012). Posteriormente, foram desenvolvidas novas gerações de sequenciadores que conseguem obter uma genotipagem mais ampla, além de serem mais econômicos e rápidos. Em 2005, os primeiros equipamentos de sequenciamento de nova geração surgiram no mercado com uma tecnologia em que uma biblioteca de fragmentos de DNA com DNAs sintéticos ligados a eles, é construída a partir do DNA de interesse (Margulies *et al.*, 2005). Diferentemente da técnica de Sanger, os sequenciadores de nova geração realizam a amplificação dos nucleotídeos e a detecção em uma só etapa, enquanto que em Sanger os processos eram realizados separadamente (Mardis, 2013). Além disso, nas novas tecnologias, amostras com baixa concentração de DNA conseguem ser sequenciado, o que não era possível antes (Shokralla *et al.*, 2014).

A primeira plataforma de sequenciamento de nova geração lançada no mercado foi a plataforma 454 da Roche que tem como princípio o pirosequenciamento (Carvalho e Silva, 2010). A partir disso, várias outras plataformas surgiram com o intuito de obter um sequenciamento mais preciso e detalhado. Um exemplo é a plataforma da Illumina/Illumina, Inc, baseada em sequenciamento por síntese (Liu *et al.*, 2012). O sequenciamento nessa plataforma

acontece em duas etapas. A primeira etapa é a amplificação de fase sólida onde o fragmento é aleatoriamente fragmentado e, adaptadores se ligam nas extremidades desses fragmentos. A segunda etapa é o sequenciamento por síntese, que ocorre em uma superfície denominada *Flow Cell*, onde aleatoriamente os fragmentos são desnaturados, distribuídos e imobilizados, sendo em seguida amplificados gerando aglomerados de fragmentos de fita simples denominado *clusters* (Metzker, 2010).

Essas novas tecnologias de sequenciamento, como as plataformas NGS Illumina (HiSeq/MiSeq/MiniSeq/NextSeq), melhoraram a qualidade das pesquisas que envolvem o genoma, principalmente pela facilidade de manuseio e da qualidade dos dados gerados, sendo empregados em diversos estudos a cerca do genoma (Metzker, 2010). Outras áreas de estudo também foram favorecidas pelo sequenciamento de nova geração, como o estudo do transcriptoma, que permite a análise de RNA a partir de cDNA (Wang *et al.*, 2009).

O transcriptoma é o conjunto de transcritos de um determinado organismo, órgão, tecido ou linhagem celular, que leva em consideração a variação espacial e temporal do material de origem (Wang *et al.*, 2009). O transcriptoma é um reflexo da expressão gênica e descreve mRNAs, RNAs não codificantes e RNAs pequenos, além de ser importante para o conhecimento de elementos funcionais do genoma, moléculas celulares, tecidos e compreender o desenvolvimento de algumas doenças (Ozsolak e Milos, 2011). A partir desse tipo de análise, também é possível observar a estrutura genômica, padrões de *splicing*, níveis de mudanças de expressão e identificar microRNAs com função reguladora e metagenômica (Ozsolak e Milos, 2011).

As primeiras análises de transcriptoma eram baseadas em tecnologias de microarranjos, que não atendiam todos os objetivos em algumas pesquisas, pois era necessário conhecer a sequência do genoma em estudo, além de que a tecnologia gerava altos níveis de background devido à hibridização cruzada e, não era possível quantificar e identificar diferentes moléculas de RNA (Royce *et al.*, 2007). Mas o sequenciamento de nova geração impulsionou o estudo da transcriptoma através do RNA-seq, contando com várias plataformas para esse tipo de análise, como: Illumina, Helicos BioSciences e Life Technologies (Lin *et al.*, 2008). Dentre essas plataformas, a Illumina HiSeq 2500 é uma das mais utilizadas devido algumas vantagens que apresenta, como a geração de alta quantidade de dados e um custo menor para o sequenciamento (Radford *et al.*, 2012).

No RNA-seq é utilizado a tecnologia de *deep-sequencing*, no qual cadeias longas de RNA são transformadas em uma biblioteca contendo fragmentos de cDNA juntamente com adaptadores ligadas à uma ou duas extremidades desses fragmentos (Barba *et al.*, 2014). As moléculas são sequenciadas para obtenção de sequências curtas de um final chamado sequenciamento *single-end*, ou dos dois lados do fragmento chamado sequenciamento *pair-end*, ambos os processos com alto rendimento (Wang *et al.*, 2009). Ocorre em seguida o alinhamento das sequências lidas com o genoma ou o transcriptoma, que pode gerar três tipos de leitura: leituras exônicas, leituras de junções e leituras de caudas terminais de poli (A) (Wang *et al.*, 2009). Os dados gerados são analisados estatisticamente gerando um perfil de expressão dos transcritos (Figura 4).

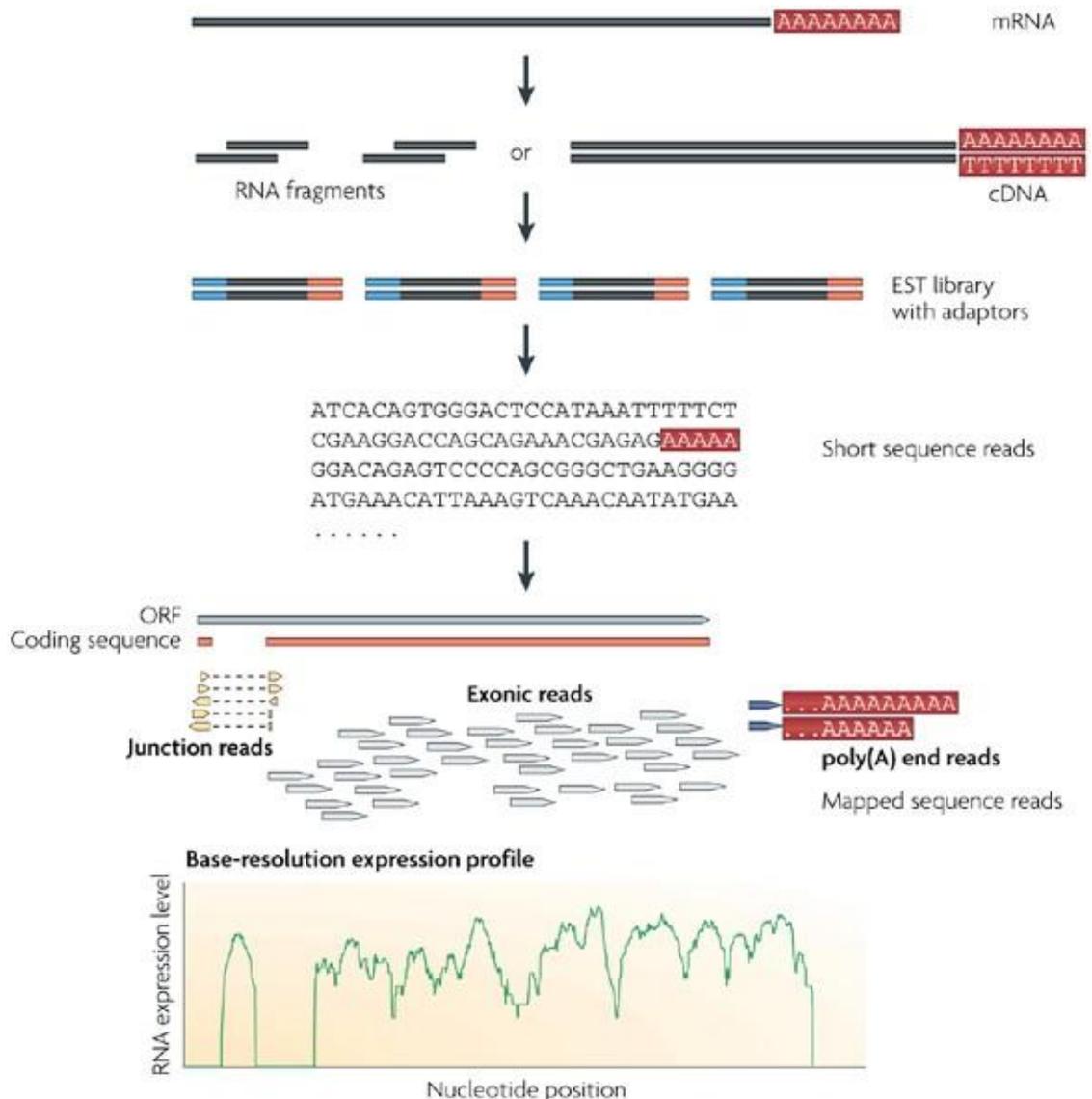


Figura 4: Fluxograma de obtenção e análise de RNA-seq. Os RNAs longos são convertidos para uma biblioteca de cDNA, através da fragmentação de RNA ou DNA. São adicionados adaptadores a cada fragmento e uma sequência curta de cDNA é gerada. As sequências restantes são lidas e alinhadas com o genoma ou transcriptoma de referência gerando três tipos de leitura: leitura exônica, leitura de junção e leitura final de poli(A). Essas leituras são usadas para gerar o perfil de expressão. Fonte: Wang *et al.*, 2009.

A tecnologia de RNA-seq apresenta vantagens em relação a outras tecnologias de sequenciamento, como revelar a localização dos limites de transição e a alta reprodutibilidade dos resultados (Ozsolak e Milos, 2011). Também se diferencia das demais técnicas por possuir baixos níveis de background, por não ter um limite de quantificação e por informar como dois exons estão conectados em leituras pequenas e a conectividade de múltiplos exons em leituras grandes (Mutz, *et al.*, 2012). O RNA-seq permite também encontrar novos transcritos, *trans-spliced*, além de genotipar SNPs (Wang *et al.*, 2009).

Outra vantagem do RNA-seq está relacionada à detecção de splicing alternativos, um processo no qual exons específicos do gene podem ficar retidos no mRNA durante a regulação da expressão gênica (Sharma e Lou, 2011). A partir do splicing uma matriz genética pode gerar inúmeras combinações de mRNAs que remetem ao mesmo gene (Xu *et al.*, 2011). Esse processo atinge a maioria dos genes humanos e são mais abundantes em alguns tecidos como cérebro (Yeo *et al.*, 2004). O estudo do transcriptoma por RNA-seq permite a identificação dessas mudanças de expressão que podem funções e expressões diversas em transcritos provindos de um mesmo gene (Dou *et al.*, 2017).

Porém, mesmo com vantagens sobre outras tecnologias, o RNA-seq apresenta desafios que precisam ser revistos. Uma das dificuldades está na manipulação da biblioteca, que pode ter a análise de dados comprometida, devido à dificuldade de manuseio e utilização dos perfis de transcrição (Wang *et al.*, 2009). Em relação às novas tecnologias de sequenciamento de forma geral, mesmo com avanços, há obstáculos a serem vencidos com o desenvolvimento de técnicas capazes de armazenar, recuperar e processar uma quantidade maior de dados que são gerados nos processos de fragmentação e sequenciamento (Wang *et al.*, 2009).

2.0 JUSTIFICATIVA

O ZIKV é um arbovírus que causou muitas epidemias em diversas regiões do mundo, incluindo o Brasil em 2015. Esse vírus pode causar complicações ao hospedeiro, principalmente no sistema nervoso, como a microcefalia ou a Síndrome Congênita do Zika (SCZ), em recém-nascidos, e a Síndrome de Guillain-Barré em adultos. Apesar da redução de casos de infecção pelo vírus, dois fatores ainda são preocupantes, a potencial reemergência do vírus e possíveis manifestações na fase adulta dos “filhos da Zika”. Desse modo, a infecção pelo vírus durante a gravidez pode estar associado ao agravamento de doenças neuropsiquiátricas manifestadas ao longo do desenvolvimento do indivíduo que ainda não são bem conhecidas. Outro fator ainda não elucidado é a associação da infecção por ZIKV com a infecção por outros flavivírus como DENV. A circulação de ambos ocorre em áreas endêmicas propícias à reprodução do vetor, sendo relatado além da co-circulação dos vírus, a co-infecção de ambos. Sabe-se que entre os sorotipos de DENV ocorre o fenômeno de ADE, no qual os anticorpos produzidos durante a infecção por um dos sorotipos promove uma intensificação da infecção durante um contágio por outro sorotipo distinto. Esse fenômeno está relacionado aos casos graves de dengue. Essa mesma situação pode ocorrer com ZIKV, pois os vírus se assemelham estruturalmente. Estudos que investigam o papel de anticorpos anti-DENV na infecção por ZIKV revelam resultados controversos, já que alguns confirmam o fenômeno, enquanto outros não apontam esse caso. Mas, em caso positivo para ADE entre os vírus, esse pode ser um fator fundamental para compreender o agravamento da patogenia de ZIKV e as complicações que podem manifestar na fase adulta do indivíduo. Nesse contexto, a análise do transcriptoma da prole de animais infectados, em modelo animal, oferece subsídios importantes para compreender os mecanismos imunológicos, celulares e moleculares que impactam no fenótipo manifestado na doença e que podem ser agravados por uma infecção prévia por outro flavivírus. Portanto, estudos são necessários para avaliar o impacto genômico da infecção por ZIKV associado ao fenômeno de ADE.

3.0 OBJETIVOS

3.1 Objetivo Geral

Avaliar a variação da expressão de genes diferenciais em cérebros de camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV, na presença ou ausência de anticorpos anti-flavivírus.

3.2 Objetivos específicos

- Identificar e descrever as alterações na expressão gênica em cérebros de camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV na presença ou ausência de 4G2;
- Identificar e descrever a função dos genes diferencialmente expressos nos grupos experimentais;
- Analisar o impacto dos genes diferencialmente expressos nas vias biológicas, considerando a presença ou ausência de 4G2;
- Caracterizar o papel de *splicing* alternativo no transcriptoma dos cérebros de camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV na presença ou ausência de 4G2.

4.0 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Ética em Experimentação Animal

A pesquisa foi realizada de acordo com a Lei Federal 11.794 (outubro de 2008), de Regulação Ética em Experimentação Animal. Os experimentos, aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais da Universidade Federal de Minas Gerais (CEUA/UFMG), foram conduzidos no Laboratório de Imunofarmacologia (nível 2 de biossegurança) do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG). Os procedimentos cirúrgicos buscaram minimizar o sofrimento animal com a utilização de anestesia de cetamina/xilazina.

4.2 Vírus, Cultura Celular e Anticorpos

Na pesquisa foi utilizado o isolado clínico contemporâneo de Zika virus (ZIKV) (HS2015-BA-01; número de acesso KX520666), obtido do soro de um paciente da cidade de Salvador (BA) infectado em 2015.

O ZIKV foi propagado nas células do mosquito vetor da espécie *Aedes albopictus* C6/36. Essas células são originadas do Banco de Células do Rio de Janeiro e serão mantidas em estufa de Demanda Bioquímica de Oxigênio (BOD) a 28 °C por 7 dias, na presença de meio L-15, suplementado com 2% de soro fetal bovino (SFB), 100 unidades/mL de penicilina, 100 µg/mL de estreptomicina (37 °C) e 5% de CO₂ (Costa *et al.*, 2017). As culturas foram centrifugadas a 2000 rpm por 10 min, obtendo o sobrenadante e os debris celulares.

O hibridoma do anticorpo monoclonal 4G2 (hibridoma D1.4G2.4.15), adquirido da *American Type Culture Collection* (ATCC; <https://www.atcc.org/Products/All/HB-112.aspx>) foi em meio obtido da precipitação por sulfato de amônio, livre de soro. Os anticorpos foram purificados por cromatografia de afinidade por proteína A/G, após diálise em tampão salina fosfato (PBS –*phosphate-buffered saline*; 0,4 M NaCl e 10 mM de NaPO₄) (Page e Thorpe, 1998).

4.3 Animais e Protocolos Experimentais

Camundongos machos e fêmeas selvagens da linhagem C57BL/6, de 6 a 8 semanas, foram obtidos no Biotério Central da UFMG e alojados no Laboratório de Imunofarmacologia do ICB/UFMG, onde foram realizados os experimentos. Cada micro-isolador continha até no máximo 5 animais, sendo que machos e fêmeas

foram acomodados em micro-isoladores diferentes até o momento do acasalamento, no qual um macho era adicionado à cada grupo de 2 a 3 fêmeas. Além disso, os animais tinham livre acesso de água e ração e estavam sob um fotoperíodo automatizado de 12:12 claro/escuro à 21-24 °C.

O ciclo estral das fêmeas de camundongos foi avaliado por citologia vaginal para determinar o momento ideal do acasalamento e obter um melhor resultado (Byers *et al.*, 2012). Dessa forma, o ideal era que as fêmeas estivessem na fase proestrus ou estrus do ciclo para serem acomodados com um único macho por 16 horas. O período após o acasalamento é considerado o dia embrionário (DE) 0,5. A gravidez foi considerada quando a fêmea permanecia na fase diestrus após o acasalamento.

Os animais grávidos foram infectados intraperitonealmente (i.p.) no DE 5,5 com 1×10^6 UFP/animal de ZIKV. Animais controle negativo receberam PBS em volume equivalente ao dos animais infectados, pela mesma via de infecção.

Com o objetivo de avaliar o papel do aumento da infecção dependente de anticorpos (ADE) na infecção pelo ZIKV, foram administrados 10 mg do anticorpo pan-flavivirus 4G2, 24 horas antes da infecção pelo vírus, sendo novamente aplicado o mesmo volume a cada 48 horas após a primeira dose (Figura 4) (Costa *et al.*, 2014).

As fêmeas grávidas foram mantidas em micro-isoladores individuais até o nascimento natural da prole. A prole foi desmamada no dia pós-natal (DPN) 21 e separada por sexo com no máximo 5 animais por micro-isolador. Os animais foram eutanasiados na 12ª semana de vida, onde foi coletado o cérebro da prole para análise de RNA-seq de três grupos experimentais: PBS, ZIKV e 4G2+ZIKV. A porção cerebral utilizada foi o córtex.

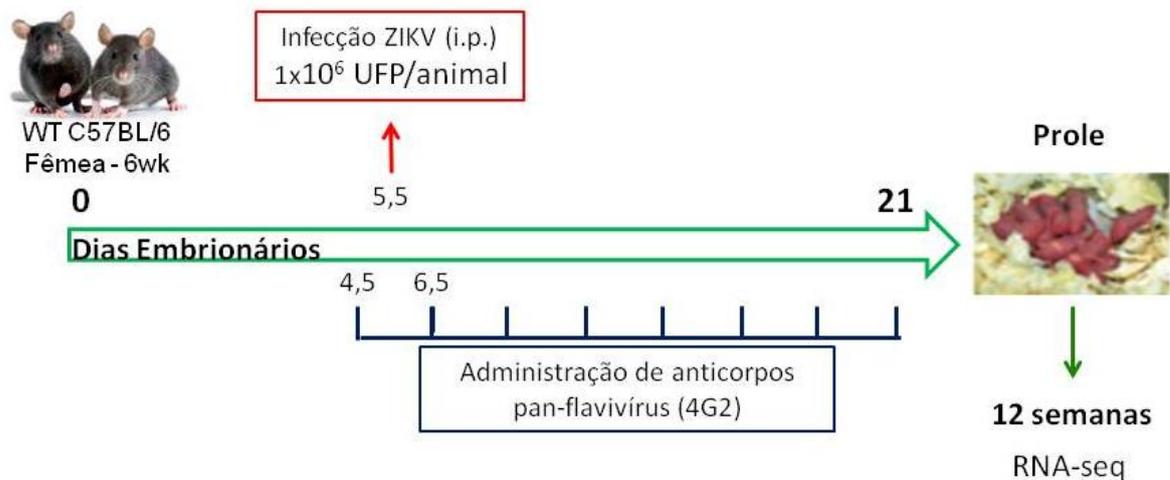


Figura 5: Estratégia experimental. Camundongos C57BL/6 grávidas receberam no DE 5,5, PBS ou 1x10⁶ UFP/animal de uma cepa de ZIKV (HS-2015-BA-01), na ausência ou presença do anticorpo pan-flavivírus 4G2. A prole foi eutanasiada após 12 semanas do nascimento para análise de RNA-seq.

4.4 Extração de RNA total e Sequenciamento (RNA-Seq)

A partir das amostras de córtex cerebral da prole com 12 semanas de vida, foi extraído o RNA total por meio do protocolo de Trizol (Invitrogen). Posteriormente, foi realizada a quantificação do RNA por fluorometria com o *Qubit® 2.0 Fluorometer* (Thermo Fisher Scientific), sendo em seguida realizada a visualização da integridade do RNA pelo Agilent 2100 bioanalyzer (Agilent) com o kit Agilent RNA 6000 Pico Kit (Agilent).

O sequenciamento foi realizado de acordo com o kit TruSeq Stranded mRNA (Illumina, San Diego, CA, USA), seguindo instruções do fabricante, para obtenção das bibliotecas de DNA complementar (cDNA). O primeiro passo foi a purificação do RNA mensageiro (mRNA) a fim de remover os RNAs ribossomais (rRNA) e contaminantes, sendo o mRNA fragmentado em seguida para a ligação dos adaptadores de 5' e 3'. As moléculas de cDNA foram sintetizadas por transcrição reversa. Por fim, essas moléculas foram amplificadas e enriquecidas.

O sequenciamento foi realizado por meio do equipamento *HiSeq 2500* (Illumina, San Diego, CA, USA), sendo sequenciadas 6 amostras do grupo PBS, 6 amostras do grupo ZIKV e 6 amostras do grupo 4G2+ZIKV.

4.5 Análise de Bioinformática e Análise Estatística

Os dados fornecidos pela plataforma de sequenciamento de nova geração foram analisados por métodos de bioinformática e análise estatística, de acordo com trabalhos publicados na literatura (Dobin *et al.*, 2013; Wang *et al.*, 2013; D'Antonio *et al.*, 2015; Finotello e Di Camillo, 2015; Walter *et al.*, 2015; Law *et al.*, 2016; Wickham, 2016; Alhamdoosh *et al.*, 2017; Weidner *et al.*, 2017) e adequação dos tipos de dados.

4.5.1 Controle de Qualidade

Foi realizado o controle de qualidade das amostras de cDNA, observando os diversos parâmetros de qualidade das bibliotecas. A análise foi feita pelo software *FASTQC* (Conesa *et al.*, 2016). A partir dos resultados do controle de qualidade, foram removidos adaptadores, leituras de baixa qualidade (Phred score <35) ou fora do padrão esperado (média de 150pb), erros de sequenciamento e leituras de baixa complexidade.

4.5.2 Alinhamento

Foi realizado o alinhamento das bibliotecas a fim de encontrar a localização onde cada leitura apresentou melhor alinhamento com a referência. A referência é o genoma de camundongo *Mus musculus* versão GRCm38.p6 do Genome Reference Consortium e o alinhamento foi obtido utilizando o programa *STAR* (Dobin; Gingeras, 2015). Em seguida, as leituras foram alinhadas ao genoma de referência de *Mus musculus*. A ferramenta *samtools* foi utilizada para converter o arquivo com o resultado do alinhamento do formato SAM para o formato BAM. O arquivo BAM foi ordenado e indexado seguindo os parâmetros: *view-bS* e *sort*.

4.5.3 Sumarização e Quantificação

As sequências mapeadas que se encontravam no formato BAM e os dados do genoma de referência que se encontravam no formato GTF foram usadas para gerar tabelas que expressam as contagens com o número de leituras alinhadas para os genes, de acordo com a condição do gene. Foi utilizado o programa *HTSeq* para esse processo (Anders *et al.*; 2015).

4.5.4 Normalização e Análise de Expressão Diferencial

A normalização das amostras foi realizada pelo método Trimmed Mean of M-values (TMM) que iguala os níveis globais de expressão dos genes entre as diferentes amostras. Nessa etapa foi utilizado o programa *DESeq2*, pelo Modelo Linear Generalizado (MLG). Esse método é capaz de corrigir as diferenças nos tamanhos das bibliotecas, pois calcula um fator de normalização que remove 30% dos genes com $\log_2 \text{FoldChange}$ (logFC) extremos, chamado valores-M (Finotello; Di Camillo.; 2015).

Os valores de cpm obtidos no *DESeq2* foram convertidos em logCPM e foi obtido a lista contendo os genes diferencialmente expressos. Nessa etapa foi utilizado o pacote *Limma-Voom*. Os genes foram selecionados de acordo com os valores de p corrigidos sendo $p \leq 0,05$ e $\logFC \leq -1$ ou ≥ 1 pelo *Wald test* (Law *et al.*; 2016).

4.5.5 Análise de Enriquecimento de Genes Sets

A análise de enriquecimento de genes sets foi realizada levando em consideração apenas os genes diferencialmente expressos (GDEs) que apresentavam valor de $p \leq 0,05$ e $\logFC \leq -1$ ou ≥ 1 .

Foi utilizado o pacote *EGSA* (Ensemble of Gene Set Enrichment Analyses) nessa etapa, pois esse programa é capaz de agregar até 12 algoritmos diferentes que ordena os genes de acordo com seus valores de p e logFC (Alhamdoosh *et al.*; 2017). Essa análise permite uma pesquisa ampla que identifica aspectos como vias moleculares de vários bancos de dados e termos de *Gene Ontology*.

4.5.6 Figuras e Gráficos

A análise de genes diferencialmente expressos foi realizada utilizando o programa *DESeq2*. As figuras e gráficos referentes às análises dos genes diferencialmente expressos, enriquecimento, Diagrama de Venn e todas as demais análises e representações gráficas foram construídos através dos pacotes listados a seguir: *EnhancedVolcano*, *VennDiagram*, *clusterProfiler*, *pathview*, *enrichplot*, *ridgeplot*, *org.Mm.eg.db*, *AnnotationDbi*, *SeqGSEA*, *biomaRt*, *ggupset*, *wordcloud* e *europemc*. Já para criação dos demais gráficos foi utilizado: *ggridges*, *ggnewscale*, *ggplot2*, *dplyr*, *glue*, *tidyverse*, *statmod*, *RColorBrewer*, *png*, *barplot*, *DOSE*, *pmcplot*, *emapplot*, *dotplot* e *cnetplot*.

5.0 RESULTADOS

5.1 Métricas do Sequenciamento

Após o alinhamento das leituras do genoma amostral com o genoma referência (*Mus musculus*), foi obtido a tabela abaixo (Tabela 1) que expressa as informações sobre os dados gerados após o sequenciamento do mRNA para cada grupo experimental. É possível observar valores de leituras, leituras alinhadas e porcentagem de leituras alinhadas para os três grupos em estudo: PBS, ZIKV e 4G2+ZIKV. Os grupos foram identificados como: V1 (PBS), V2 (ZIKV) E V3 (4G2+ZIKV).

Tabela 1: Métricas do Sequenciamento

ID das amostras	Total de reads	Total de reads mapeadas	% Total de reads mapeadas	Reads mapeadas apenas uma vez	% Reads mapeadas apenas uma vez
V1.1 (PBS)	18.367.262	18.018.988	98,1	17.101.565	93,11
V1.2 (PBS)	24.550.379	24.112.253	98,22	22.774.676	92,77
V1.3 (PBS)	21.039.141	20.659.656	98,2	19.505.065	92,71
V1.4 (PBS)	20.934.662	20.580.058	98,31	19.419.533	92,76
V1.5 (PBS)	19.498.455	19.150.635	98,22	18.079.571	92,72
V1.6 (PBS)	20.570.365	20.209.663	98,25	18.989.070	92,31
V2.1 (ZIKV)	20.841.192	20.479.537	98,26	19.367.866	92,93
V2.2 (ZIKV)	20.060.215	19.711.883	98,26	18.620.389	92,82
V2.3 (ZIKV)	22.419.387	21.935.362	97,84	20.704.522	92,35
V2.4 (ZIKV)	22.510.455	21.872.957	97,17	20.768.647	92,26
V2.5 (ZIKV)	20.463.594	20.031.690	97,89	18.940.667	92,56
V2.6 (ZIKV)	18.367.262	18.018.988	98,1	17.101.565	93,11
V3.1 (4G2+ZIKV)	19.774.676	19.374.995	97,98	18.339.982	92,74
V3.2 (4G2+ZIKV)	20.322.334	19.790.520	97,38	18.741.757	92,22
V3.3 (4G2+ZIKV)	21.101.684	20.615.978	97,7	19.459.458	92,22
V3.4 (4G2+ZIKV)	20.252.702	19.770.172	97,62	18.729.596	92,48
V3.5 (4G2+ZIKV)	21.500.885	21.070.345	98	19.911.777	92,61
V3.6 (4G2+ZIKV)	25.346.693	24.813.381	97,9	23.399.266	92,32

A tabela destaca o resultado após o mapeamento das leituras para as condições estudadas e suas réplicas biológicas.

5.2 Expressão Diferencial entre os Grupos Experimentais

A análise de expressão diferencial foi realizada comparando os grupos experimentais entre si, sendo, portanto V1XV2 e V2XV3. O experimento possui duas variáveis, sendo a primeira a infecção pelo ZIKV e a segunda variável a ausência ou

presença do anticorpo pan-flavivírus 4G2, que simula uma infecção prévia por outro flavivírus como DENV.

De acordo com os parâmetros estabelecidos, no qual são considerados genes diferencialmente expressos aqueles que apresentavam valor de $p \leq 0,05$ e $\log_2FC \leq -1$ ou ≥ 1 , a análise de transcriptoma identificou 83 genes que seguem os parâmetros definidos para expressão diferencial. Dos 83 genes observados, 7 pertencem à comparação entre V1XV2, 43 pertencem à comparação V1XV3 e 33 pertencem à comparação V2XV3. Aqui destacamos preferencialmente os grupos V1XV2 e V2XV3, mas os resultados de todas as análises descritas a seguir referentes à V1XV3 encontram-se no Anexo A (Tabela 4 e Figuras 25 a 32).

Em relação à análise V1XV2, dois genes foram regulados positivamente enquanto que 5 genes foram regulados negativamente (Tabela 2). Já na comparação entre V2XV3, foram observados 24 genes regulados positivamente enquanto que 9 genes foram regulados negativamente (Tabela 3).

Tabela 2: Genes diferencialmente expressos em V1XV2.

Gene	External Gene Name	<i>log2FoldChange</i>	<i>pvalue</i>
Gm12447	ENSMUSG00000080816	1,145336326	0,0047205
A630072M18Rik	ENSMUSG00000101013	1,139967726	0,0024714
Slc9a4	ENSMUSG00000026065	-1,013084525	0,0291473
Prss56	ENSMUSG00000036480	-1,049779059	0,0236298
C1ql2	ENSMUSG00000036907	-1,232632723	0,0395721
Scgn	ENSMUSG00000021337	-1,523558647	0,0471896
Gm37795	ENSMUSG00000102813	-1,561331713	0,0007331

A tabela mostra em ordem decrescente do valor de *log2 FoldChange* os genes diferencialmente expressos na comparação entre V1XV2, bem como os valores de *pvalue*.

Tabela 3: Genes diferencialmente expressos em V2XV3.

Gene	External Gene Name	<i>log2FoldChange</i>	<i>pvalue</i>
Capn11	ENSMUSG00000058626	2,23746583	0,0134429
Zbp1	ENSMUSG00000027514	1,939635305	0,0024888
Ifi2712a	ENSMUSG00000079017	1,878482318	0,0038709
Ifi204	ENSMUSG00000073489	1,680241705	0,0071467
Ifi209	ENSMUSG00000043263	1,67160392	0,0002335
Avp	ENSMUSG00000037727	1,530022927	0,0109115
Shisal2b	ENSMUSG00000042655	1,399918912	0,0073839
Gm12250	ENSMUSG00000082292	1,253608777	0,0041768
Gm45809	ENSMUSG00000109708	1,221330623	0,0002519
Lilra5	ENSMUSG00000070873	1,185900623	0,0055488
Nlrp1c-ps	ENSMUSG00000092528	1,162451743	0,0224368
Gm13778	ENSMUSG00000086495	1,143730253	0,0191743
Lgals3bp	ENSMUSG00000033880	1,141098015	0,0022666
Tgtp1	ENSMUSG00000078922	1,11516732	0,0068682
Gm37212	ENSMUSG00000104026	1,106978243	0,0113241
Il20ra	ENSMUSG00000020007	1,097229535	0,0249426

<i>Npff</i>	ENSMUSG00000023052	1,098357026	0,0162692
<i>Gm32633</i>	ENSMUSG00000108393	1,085543294	0,034847
<i>Gsx1</i>	ENSMUSG00000053129	1,085543294	0,0277245
<i>Gm4951</i>	ENSMUSG00000073555	1,06595561	0,0066996
<i>H2-Q6</i>	ENSMUSG00000073409	1,057293175	0,0034483
<i>Gm43389</i>	ENSMUSG00000106665	1,028155546	0,0057348
<i>Gm37795</i>	ENSMUSG00000102813	1,025842524	0,0489722
<i>Gm37755</i>	ENSMUSG00000103382	1,007736599	0,0207339
<i>9130227L01Rik</i>	ENSMUSG00000099950	-1,000871664	0,0152265
<i>Gm37019</i>	ENSMUSG00000102953	-1,021938326	0,0379402
<i>Gm44229</i>	ENSMUSG00000108088	-1,031242346	0,0269402
<i>Depp1</i>	ENSMUSG00000048489	-1,040816184	0,0028546
<i>Fos</i>	ENSMUSG00000021250	-1,058073534	5,225E-06
<i>Egr2</i>	ENSMUSG00000037868	-1,058558324	0,0034529
<i>Hmcn1</i>	ENSMUSG00000066842	-1,081457036	1,299E-09
<i>Magix</i>	ENSMUSG00000031147	-1,086360127	0,0076300
<i>Ccn1</i>	ENSMUSG00000028195	-1,088890699	3,003E-14

A tabela mostra em ordem decrescente do valor de \log_2 *FoldChange* os genes diferencialmente expressos na comparação entre V2XV3, bem como os valores de pvalue.

Dessa forma, foi observada uma quantidade maior de genes diferencialmente expressos na presença de 4G2, expressos em V2XV3, sendo em sua maioria genes ativados, do que na ausência de 4G2 expressos em V1XV2, sendo em sua maioria reprimidos.

Após uma análise cruzada entre os genes diferencialmente expressos observados em cada grupo experimental, foi observado que nenhum gene é compartilhado entre os três grupos experimentais (Figura 6).

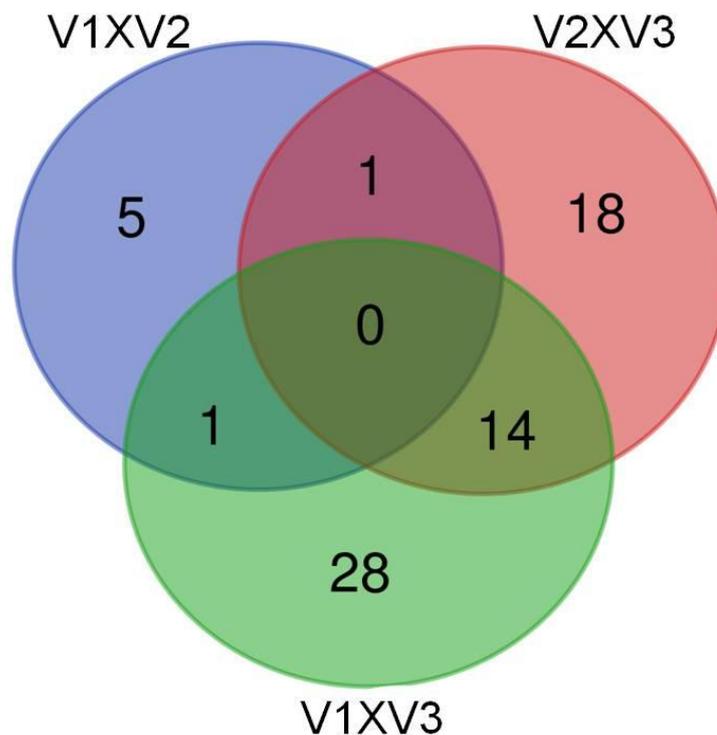


Figura 6: Diagrama de Venn. O diagrama mostra os genes diferencialmente expressos ($p \leq 0,05$ e $\log_{2}FC \leq -1$ ou ≥ 1) entre os grupos experimentais. Não há genes na interseção entre os três grupos. Entre V1XV2 e V1XV3 é observado um gene na interseção dos grupos, entre V1XV2 e V2XV3 é observado um gene na interseção dos grupos e entre V1XV3 e V2XV3 são observados 14 genes na interseção dos grupos.

Os resultados de V1XV2 mostram que 5 genes são expressos exclusivamente nesse grupo, enquanto que um gene (*Gm12447*) é compartilhado com V1XV3 e um gene (*Gm37795*) com V2XV3. O gene *Gm37795* compartilhado entre V1XV2 e V2XV3 é suprimido na ausência de 4G2 (V1XV2) e ativado na presença de 4G2 (V2XV3).

Todavia, os resultados de V2XV3 revelam 18 expressos exclusivamente nessas condições experimentais, enquanto que um gene encontra-se na interseção de V1XV2. Porém, na interseção com V1XV3 são observados 14 genes diferencialmente expressos (*Ifi2712a*, *Ifi209*, *Zbp1*, *Gm4951*, *H2-Q6*, *Gm37755*, *Ifi204*, *Nlrp1c-os*, *Tgtp1*, *Lgals3bp*, *Depp1*, *Hmcn1*, *Gm44229* e *Magix*). Desses genes comuns entre V1XV3 e V2XV3, 10 são ativados em ambos os casos e 4 são suprimidos nas duas condições experimentais.

5.3 Análise de Expressão Diferencial por Volcano plot

O gráfico de Volcano plot é um gráfico de dispersão que mostra a significância estatística (valor P) e a magnitude da mudança (mudança da dobra) expressa em $\log_{2} FoldChange$. Assim, é possível identificar os genes com maiores alterações de acordo com $\log_{2}FC$ de cada um e que também são estatisticamente significativos (Doyle, 2021). Dessa forma, o gráfico ilustra os dados da tabela de genes diferencialmente expressos. Os genes mais expressos são representados a direita do gráfico e os genes menos expressos à esquerda.

Os grupos experimentais V1 (PBS) e V2 (ZIKV) foram comparados entre si e apresentaram 7 genes diferencialmente expressos entre eles. Desses genes, dois foram expressos positivamente e 5 expressos negativamente de acordo com os padrões determinados ($p \leq 0,05$ e $\log_{2}FC \leq -1$ ou ≥ 1), representados em vermelho no gráfico (Figura 7). Dessa forma, foram observados mais genes sendo suprimidos comparados aos genes ativados.

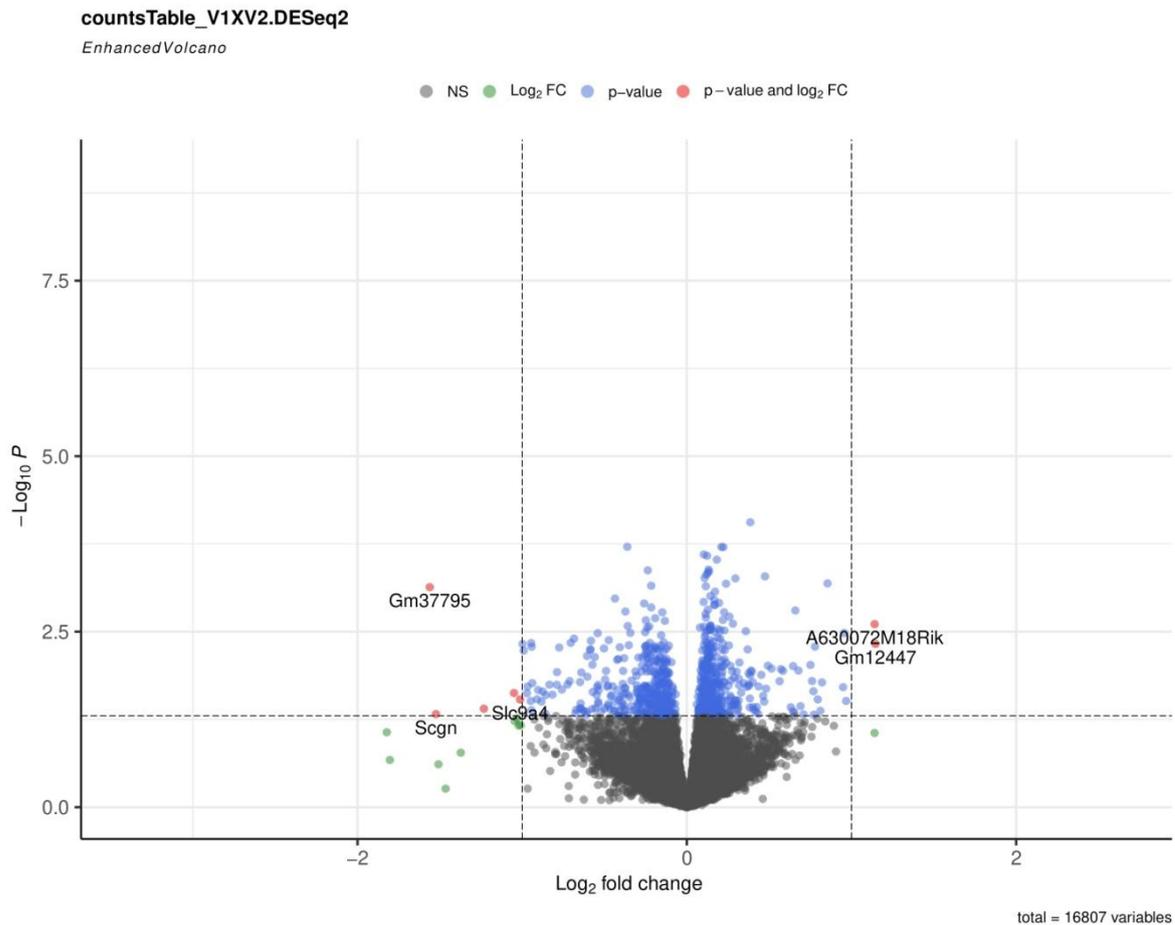


Figura 7: Volcano plot V1XV2. O gráfico mostra os genes diferencialmente expressos em V1XV2 de acordo com as métricas: $p \leq 0,05$ e $\log_2 FC \leq -1$ ou ≥ 1 .

Já quando comparados os grupos experimentais V2 (ZIKV) e V3 (4G2+ZIKV) foi possível observar 33 genes diferencialmente expressos entre os grupos. Desses genes, 24 foram expressos positivamente e 9 expressos negativamente de acordo com os padrões determinados ($p \leq 0,05$ e $\log_2 FC \leq -1$ ou ≥ 1) (Figura 8). Dessa forma, foram observados mais genes sendo regulados positivamente comparados aos genes suprimidos de acordo com os pontos em vermelho no gráfico. Mesmo alguns genes suprimidos apresentarem maior significância estatística, os genes com maior alteração da dobra foram ativados.

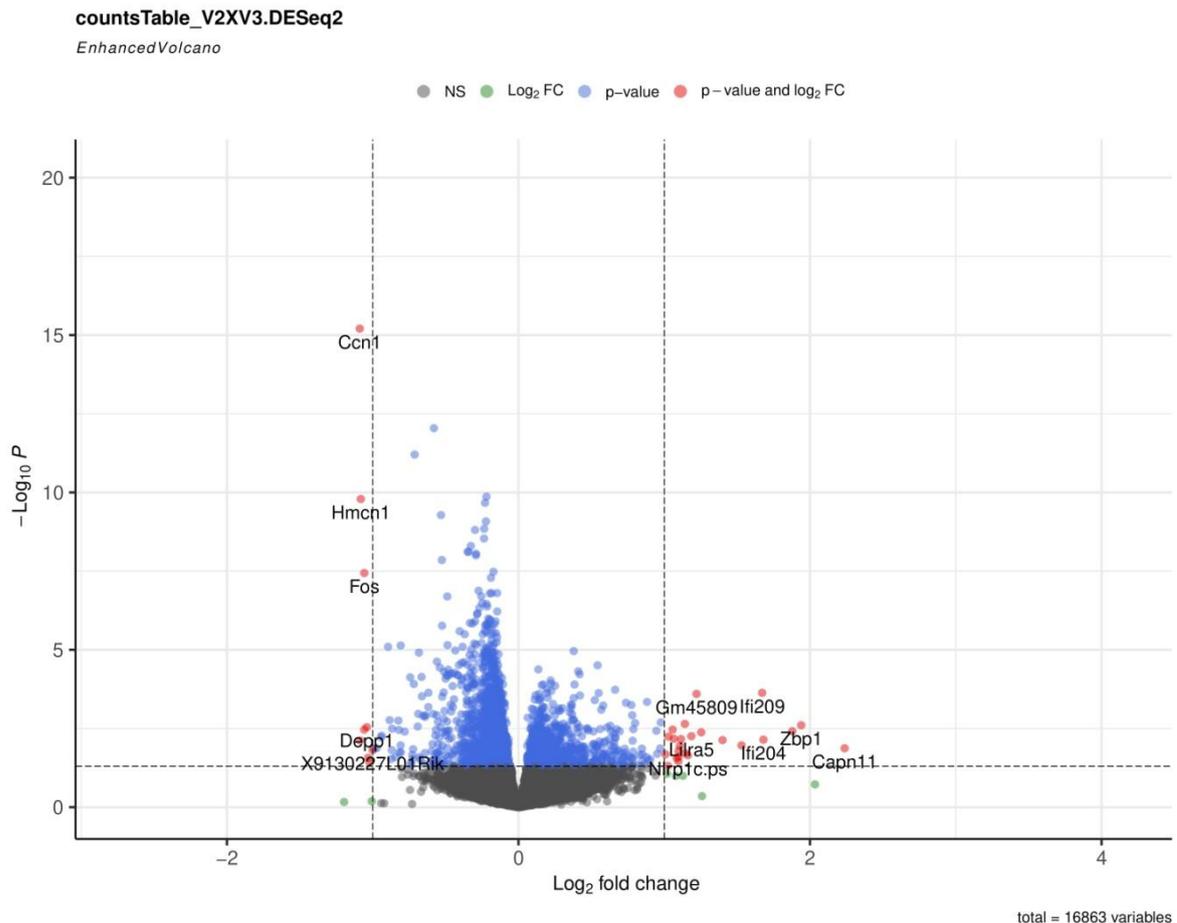


Figura 8: Volcano plot V2XV3. O gráfico mostra os genes diferencialmente expressos em V2XV3 de acordo com as métricas: $p \leq 0,05$ e $\log_{2}FC \leq -1$ ou ≥ 1 .

5.4 Análise Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos

A função dos genes diferencialmente expressos em todos os grupos experimentais foi investigada a fim de correlacionar o papel desses genes no organismo durante a infecção por ZIKV, considerando a presença ou ausência do anticorpo 4G2. Foram utilizados bancos de dados com informações já descritas para análise funcional dos genes.

A primeira análise entre os grupos V1 e V2 revelou 7 genes diferencialmente expressos de acordo com os parâmetros ($p \leq 0,05$ e $\log_{2}FC \leq -1$ ou ≥ 1), onde dois genes tiveram expressão positiva, sendo eles *Gm12447* e *A630072M18Rik* (Anexo B, Tabela 5). Após análise no banco de dados não foram identificados aspectos como função, vias moleculares e expressão para ambos os genes, principalmente *Gm12447*. Para o gene *A630072M18Rik*, foi mencionado a presença dele no cDNA de timo de neonato em um banco de dados, mas sem especificações e outras informações.

Dentre os genes reprimidos, apenas um não apresentou função descrita, o gene *Gm37795*, sendo esse o com menor logFC. Porém, é observada a presença de miRNAs relacionados a esse gene. Os demais genes são *Slc9a4*, *Prss56*, *C1ql2* e *Scgn* que possuem função de regulação de pH, transdução de sinal e absorção de sódio; desenvolvimento ocular; regulação do número de sinapses de neurônios do hipocampo e papel na regulação e ligação de íons de cálcio, respectivamente. Além disso, esses genes possuem impacto em processos biológicos como ciclo celular, manutenção da homeostase, alterações em etapas ou componentes do ciclo celular, fatores de coagulação do sangue, regulação e transportes de íons transmembrana e atividade de células imunes.

A função dos 33 genes diferencialmente expressos em V2XV3, também foi investigada (Anexo B, Tabela 6). Entre os 24 genes regulados positivamente, 5 não apresentaram funções descritas nos bancos de dados, sendo eles: *Gm45809*, *Gm13778*, *Gm37212*, *Gm32633* e *Gm43389*. Entre esses genes ativados também foram observados dois genes relacionados à miRNAs; *Gm37795* e *Gm37755*, mas que não apresentaram outras informações relacionados a função nos bancos de dados. Já nos genes regulados negativamente, 3 ainda não foram descritos, não tendo, portanto, função informada nos bancos de dados, sendo os genes *9130227L01Rik*, *Gm37019* e *Gm44229*.

Muitos genes ativados apresentaram função relacionada ao sistema imune, como ativação e regulação induzida por interferon, ativação da resposta imune inata, ativação do processo inflamatório, regulação de citocinas com IL-12, IL-13, IL-10, IL-6 e TNF além de influência e ativação de cascata MAPK, processamento de antígeno e apresentação de antígeno de peptídeo endógeno via MHC classe Ib e mecanismos envolvidos na resistência celular induzida por patógenos. Os genes envolvidos nessas funções são: *Ifi2712a*, *Ifi209*, *Tgtp1*, *H2-Q6* e *Lilra5*. Além disso, o gene *Il20ra* também mostrou ser importante em processos imunes, já que representa um dímero receptor para IL-19, IL-20 e IL-24 e para IL-26. Quanto aos processos biológicos em que esses genes estão envolvidos e que não esteja relacionado ao sistema imune, dois deles apresentam participação também na indução de apoptose e na adesão celular. Destaca-se ainda que os genes *Ifi2712a*, *Ifi209*, *Tgtp1* e *H2-Q6* foram ativados também em V1XV3, pertencendo ao conjunto de genes compartilhados entre esses grupos.

Um conjunto de genes demonstrou ser importante no ciclo celular e na manutenção celular e do material genético. Os genes *Zbp1*, *Ifi204*, *Gm12250*, *Nlrp1c-ps* e *Lgals3bp* atuam no reconhecimento de estruturas de Z-RNA produzidos por vírus, desencadeando morte celular, na inibição da transcrição do RNA ribossômico, no processo de apoptose, nos estágios do ciclo celular e adesão celular mediada por integrinas. Esses genes, além de processos biológicos relacionados à manutenção celular, também participam de processos relacionados ao sistema imune e ao seu funcionamento, a processo inflamatório, resposta à patógenos e na morfogênese e neurogênese. Além disso, todos esses genes, exceto o gene *Gm12250*, são ativados em V1XV3, sendo, portanto compartilhados entre os grupos experimentais.

Outros 6 genes regulados positivamente apresentaram funções distintas aos comentados anteriormente. O gene *Avp* atua ligando-se aos receptores da vasopressina e participa de processos biológicos relacionados ao ciclo celular, ao metabolismo, à apoptose e à manutenção da homeostase. O gene *Shisal2b* está relacionado ao índice de massa corporal, enquanto que o gene *Npff* está vinculado à um neuropeptídeo modulador de morfina, além de estar presente também em processo biológicos, tais como no processo inflamatório, morfogênese, neurogênese e no metabolismo. O gene *Gsx1* é importante no desenvolvimento da hipófise. Já o gene *Gm4951* atua na atividade de GTPase. Por fim, o gene *Capn11*, que apresentou maior logFC do grupo analisado, está relacionado à uma protease não lisossomal regulada por cálcio que catalisa proteólise limitada de substratos envolvidos na remodelação do citoesqueleto e transdução de sinal.

No grupo de genes suprimidos, apenas 6 tinham função descrita no banco de dados. O gene com menor logFC foi o gene *Ccn1*, que atua na promoção da proliferação celular, quimiotaxia, angiogênese e adesão celular. O gene *Magix* é importante na manutenção de componentes plaquetários no sangue. Já o gene *Hmcn1* promove a maturação do sulco de clivagem durante a citocinese em embriões pré-implantação. Enquanto isso, o gene *Egr2* desempenha um papel na segmentação do cérebro posterior. Por fim, os genes que apresentaram menor regulação negativa, *Depp1* e *Fos*, têm como função modulação crítica da autofagia induzida por FOXO3 via aumento de ROS celulares e papel no desenvolvimento das células destinadas a formar e manter o esqueleto, respectivamente. Portanto, os genes suprimidos atuam em processos biológicos relacionados ao ciclo celular,

morfogênese, metabolismo, processos de autofagia e apoptose. Desses genes regulados negativamente, três (*Depp1*, *Hmcn1* e *Magix*) também foram suprimidos em V1XV3, pertencendo também aos genes compartilhados entre esses grupos experimentais (Anexo B, Tabela 7).

5.5 Enriquecimento de Vias

Após a análise funcional dos genes diferencialmente expressos em cada grupo experimental, foi realizado o enriquecimento de via por *Gene Ontology* representado pelo gráfico de *Dot plot*. O gráfico de *Dot plot* mostra as vias alteradas na comparação entre os grupos por meio de sobreposição de pontos. Para análise do gráfico, vale ressaltar que quanto maior o ponto, maior a quantidade de genes alterados relacionados a essa via indicada e quanto mais próxima de vermelho, menor o valor de p ($p \leq 0,05$), o que indica maior evidência contra a hipótese nula; ou seja, maior alteração nas vias em questão. Além disso, a posição de cada ponto no gráfico indica o percentual de alteração em cada via que varia de 0 a 100%.

O primeiro grupo analisado foi V1XV2, onde várias vias foram alteradas, sendo que essas vias corroboram para os resultados observados na análise funcional do grupo em questão (Figura 9).

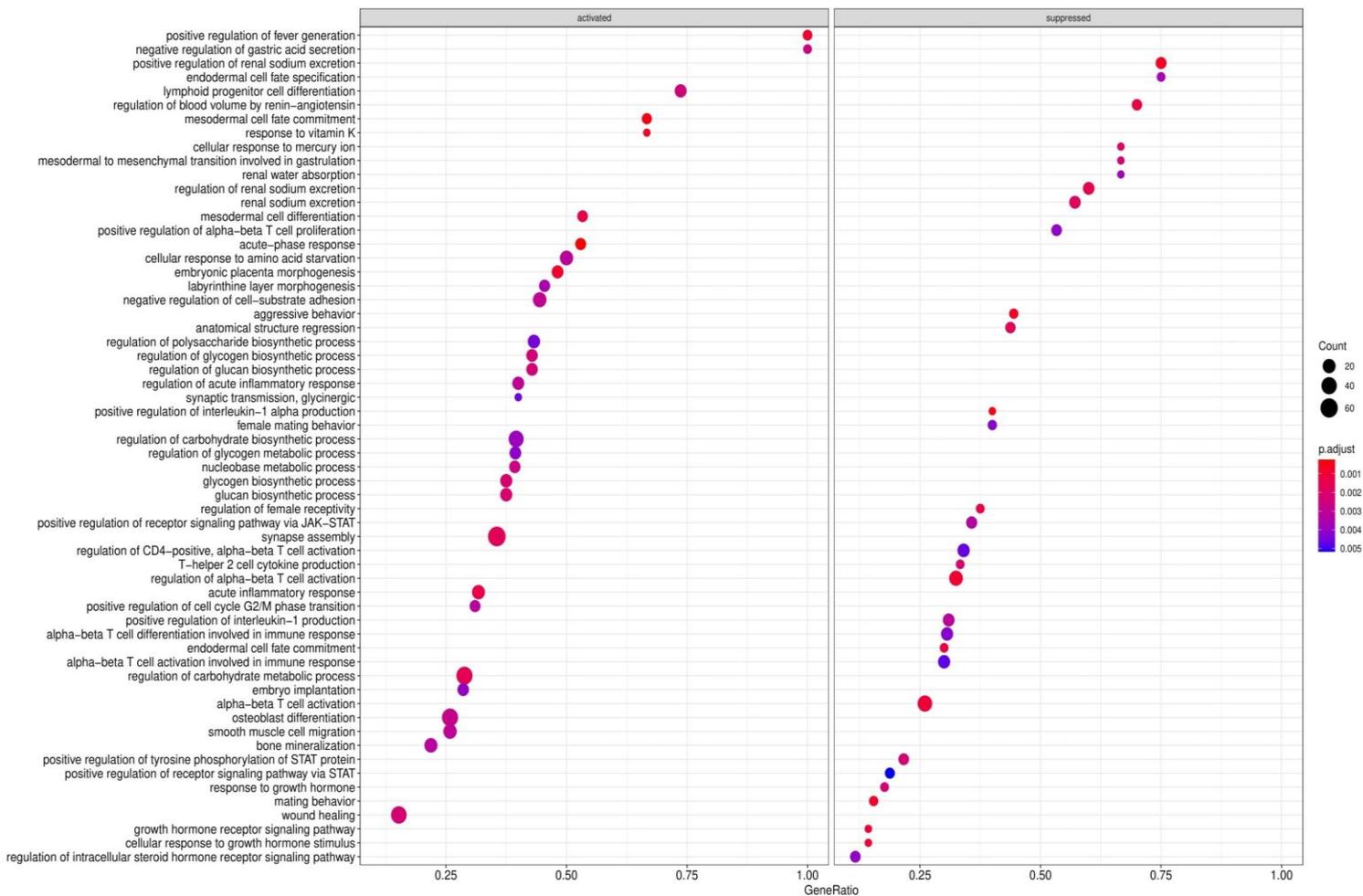


Figura 9: Dot plot V1XV2. O gráfico mostra as principais vias alteradas pelos genes diferencialmente expressos em V1XV2, pela sobreposição dos pontos.

A coluna à esquerda indica as vias alteradas em genes ativadas. Quanto mais próximo de 0,2 menor a porcentagem de alteração da via em questão e quanto mais próximo de 0,8, maior a porcentagem de alteração da via. Para esses genes foram observadas alterações principalmente em vias relacionadas ao ciclo celular e material genético e a formação de tecidos. Quanto ao ciclo celular, foram enriquecidas vias relacionadas à transição da fase G2/M do ciclo com significância média, assim como a quantidade de genes e com alteração de aproximadamente 30% da via. Outras vias nesse contexto também tiveram resultados parecidos, com alteração em mais de 50% da via e estando relacionados a diferenciação de células teciduais. Já em relação às vias alteradas relacionadas à formação de tecidos, as principais observações são em relação ao processo embrionário e a formação de tecidos do embrião. Vias como de morfogênese placentária e de implantação do

embrião, foram ~48% e ~26% modificada respectivamente, mas ambas com significância e quantidade média de genes responsáveis pelas alterações.

A coluna da direita indica vias alteradas por genes suprimidos. Quanto mais próximo de 0,2 menor a porcentagem de alteração da via em questão e quanto mais próximo de 0,8, maior a porcentagem de alteração da via. Dessa forma, quanto aos genes regulados negativamente, houve muitas alterações em vias relacionadas ao sistema imunológico e a processos desse sistema. Essas vias foram modificadas em 53% e 25% aproximadamente, com valor de p médio de acordo com os valores do gráfico e com frequência de genes relacionados a essas vias também com valor médio. Destacam-se vias importantes na resposta imune como proliferação e ativação de células T, resposta na fase aguda da infecção, produção de interleucinas e outras citocinas.

Outras vias foram enriquecidas nesse grupo experimental, tanto em genes ativados quanto em genes suprimidos. Essas vias apresentaram parâmetros médios de acordo com a escala gráfica e estão relacionadas a diversas funções no organismo, como resposta a absorção de vitaminas, absorção de água, metabolismo de sódio, processo biossintético de proteínas, polissacarídeos, glicogênio e carboidratos.

A mesma análise foi realizada para o grupo V2XV3 onde foram observadas alterações em vias semelhantes às funções descritas nos bancos de dados (Figura 10).

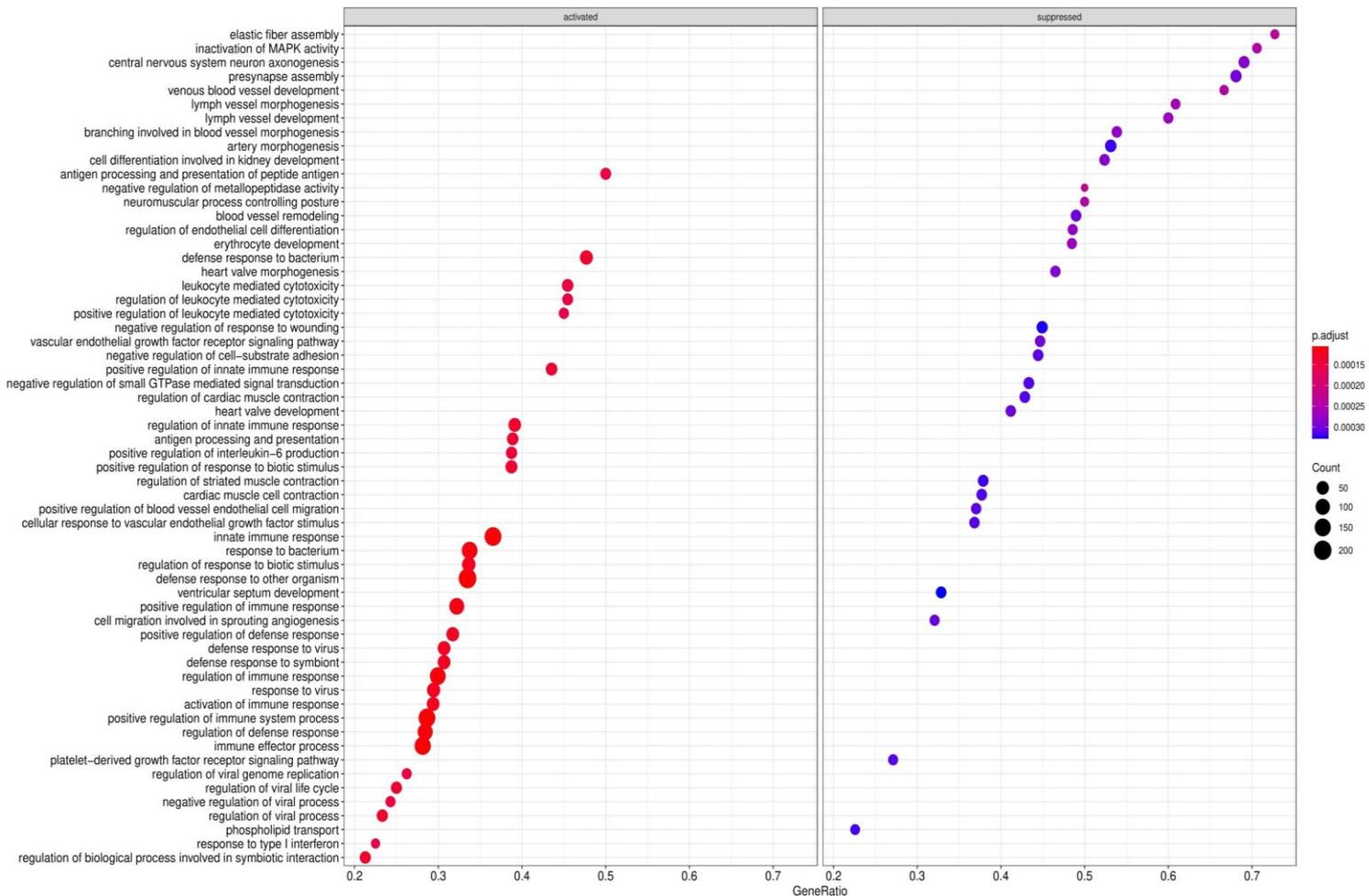


Figura 10: Dot plot V2XV3. O gráfico mostra as principais vias alteradas pelos genes diferencialmente expressos em V2XV3, pela sobreposição dos pontos.

Novamente, a coluna à esquerda indica as vias alteradas em genes ativadas positivamente. Semelhante ao observado no grupo anterior, os genes ativado interferiram prioritariamente em vias relacionadas ao sistema imune. Essas vias foram alteradas entre ~23% e ~71% de toda sua extensão e apresentou valor de p muito bom e muitos genes relacionados a essas alterações. Alguns exemplos de vias enriquecidas nessas condições são processamento e apresentação de antígeno, resposta imune a microrganismos, regulação de citotoxicidade mediada por leucócitos, regulação da resposta imune inata, produção de interleucinas, resposta do sistema imune efetor e resposta a interferon. Foi observado também enriquecimento médio no ciclo de vida viral, de acordo com a escala gráfica.

Quanto às vias suprimidas grande parte está relacionada à morfogênese e formação tecidual. Essas vias apresentaram parâmetros baixos quanto à frequência

de genes e significância, mas tiveram modificação na via com media de aproximadamente 50%. Genes relacionados à formação do sistema nervoso, sistema linfático e sistema cardiovascular são responsáveis pela supressão dessas vias. Ainda entre as vias suprimidas, observa-se supressão em aspectos celulares, como diferenciação celular.

Como reforço dos resultados anteriores, foi realizado o enriquecimento de via também por *Ridge plot* a partir do *Gene Ontology*. Para compreensão desses resultados, é importante ressaltar que o gráfico mostra uma sobreposição de gráficos que geram curvas. Dessa forma, quanto maior o pico de cada curva maior a quantidade de genes relacionados à via indicada, enquanto que quanto mais próximos da cor vermelha forem esses picos, menor o valor de p.

O gráfico de *Ridge plot* do grupo V1XV2 mostra resultados semelhantes ao observado anteriormente no gráfico de *Dot plot* quanto às vias alteradas (Figura 11).

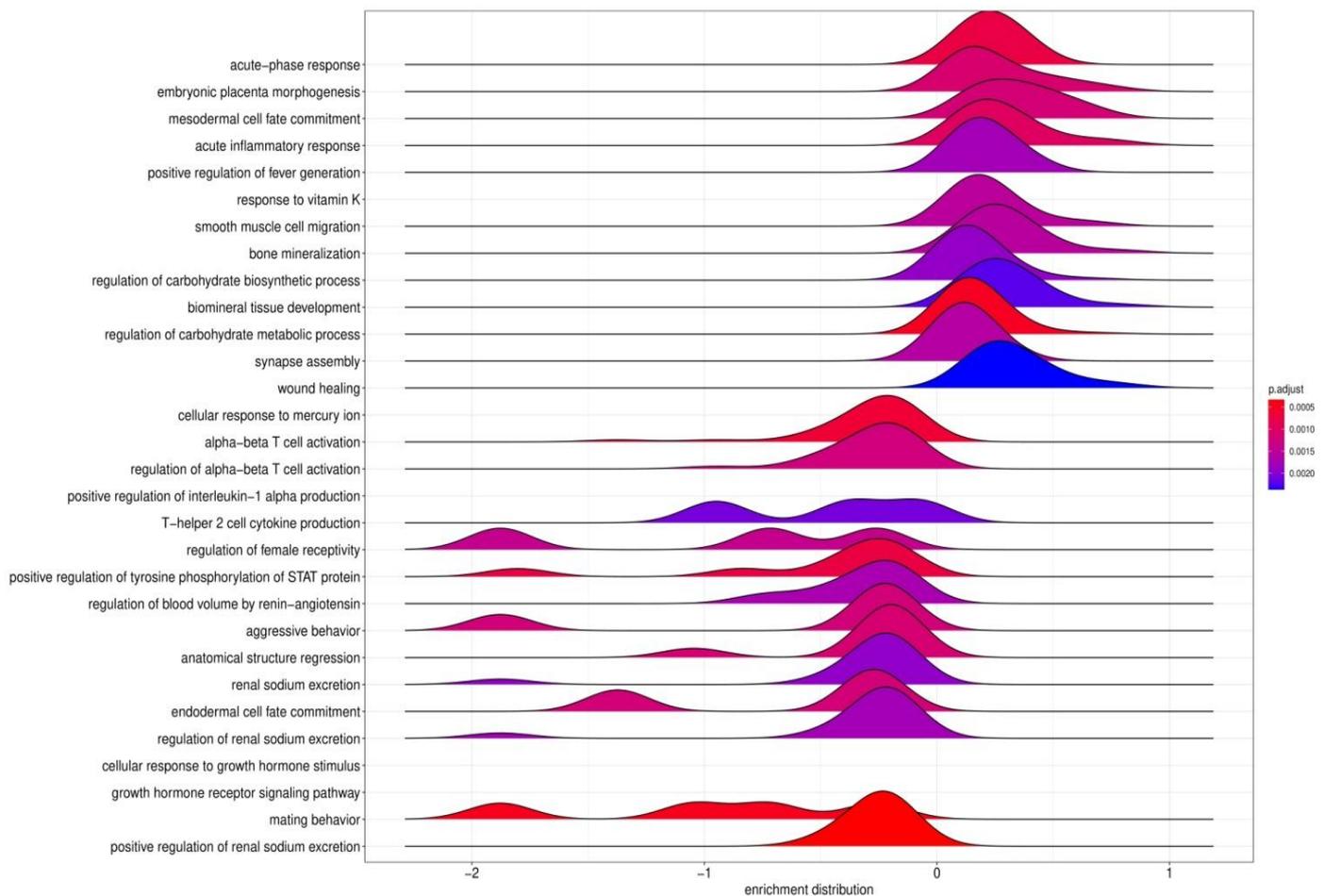


Figura 11: Ridge plot V1XV2. O gráfico mostra as principais vias alteradas pelos genes diferencialmente expressos em V1XV2, pela sobreposição de gráficos que mostram a intensidade da alteração na via.

Semelhante ao observado na análise de enriquecimento de via por *Dot plot*, nos genes ativados positivamente, à direita do ponto 0 no eixo, a via de alterações no ciclo celular é expressa com alta frequência e valor de p baixo. Nesses mesmos parâmetros é observado enriquecimento na via de morfogênese da placenta. Também foi observado alteração na resposta de fase aguda, metabolismo de vitaminas e mineralização óssea. Quanto aos genes suprimidos, à esquerda de 0 no eixo, as vias alteradas com maior frequência são as vias de regulação de sódio, vias de produção de citocinas e ativação de células T.

Dessa forma, a análise de enriquecimento de vias apresentou resultados que se assemelham à análise nos bancos de dados, tendo em vista que os genes diferencialmente expressos em V1XV2 impactam em funções que condizem com as vias alteradas.

De modo semelhante, foi realizada a mesma análise no grupo V2XV3 (Figura 12).

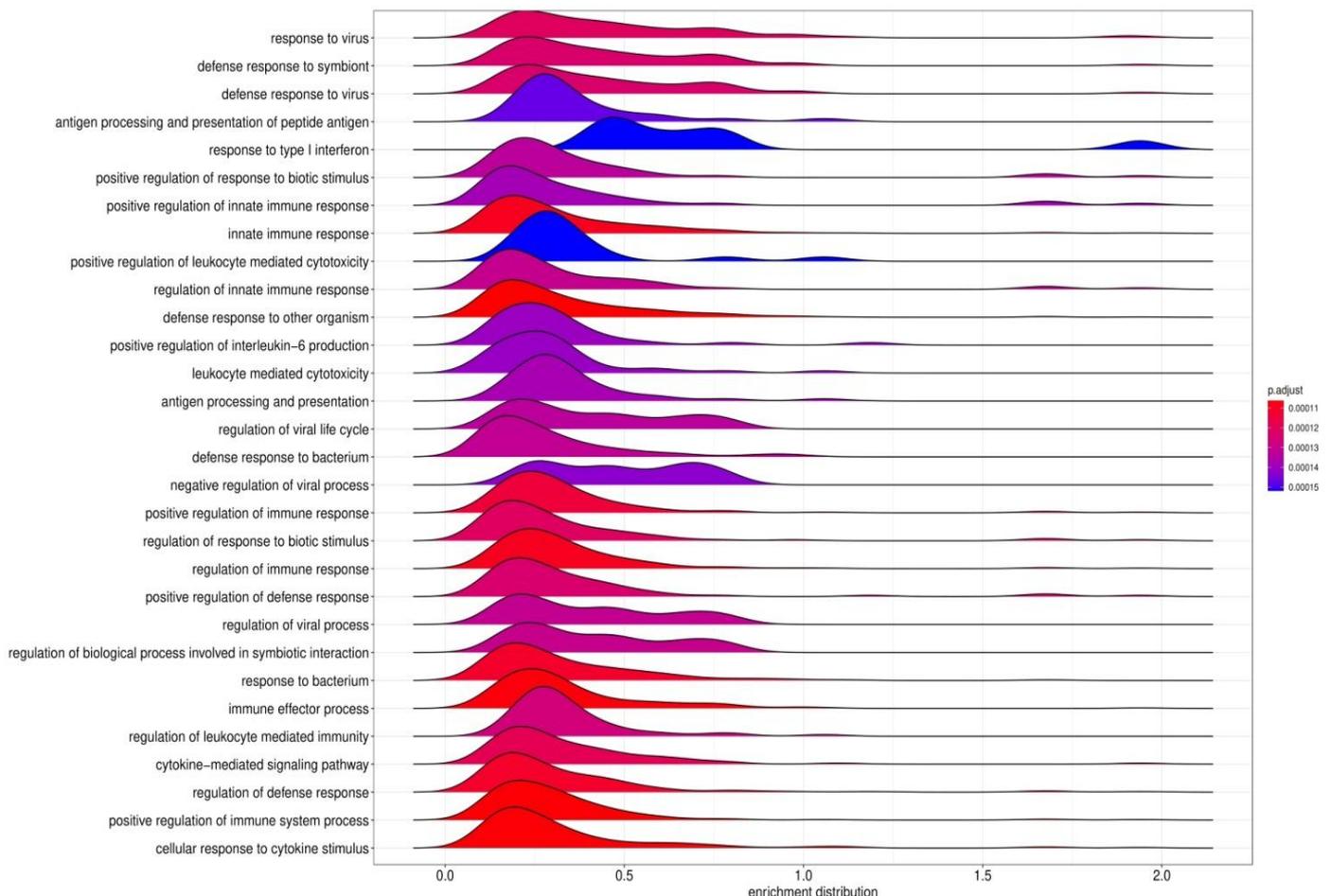


Figura 12: Ridge plot V2XV3. O gráfico mostra as principais vias alteradas pelos genes diferencialmente expressos em V2XV3, pela sobreposição de gráficos que mostram a intensidade da alteração na via.

Foi observada alta frequência de expressão positiva de algumas vias, independente do valor de p , representado ao lado direito do eixo 0 no gráfico. Novamente, as principais vias representadas no gráfico estão relacionadas com alguma etapa da resposta imune. Foram alteradas principalmente as vias de resposta celular ao estímulo de citocinas, regulação positiva do sistema imune e da resposta de defesa, além de regulação da resposta imune efetora. Também foram alteradas a atividade de células de defesa, do ciclo viral e interferon tipo I.

Assim, os dois modelos de gráfico esboçam as vias enriquecidas em todas as condições experimentais e que mostraram comprometimento na condição do grupo de estudo e condizem com as funções observadas nos bancos de dados dos genes diferencialmente expressos em V2XV3.

5.6 Análise de Enriquecimento do Conjunto Genético

Após análise de enriquecimento de via pelas técnicas já descritas, foi realizada a Análise de Enriquecimento do Conjunto Genético (GSEA). Esse método observa se um determinado conjunto de genes é enriquecido significativamente de acordo com o fenótipo observado nos grupos de interesse. Os genes são ordenados de acordo com a relação com o fenótipo e mantém esse padrão de distribuição (Subramanian *et al.*, 2005). Portanto, para compreensão dos resultados expressos na forma de gráfico é necessário compreender que a parte superior da imagem indica os genes enriquecidos dentro do conjunto funcional. A quantidade de barras indica a quantidade de genes expressos e a posição, acima ou abaixo de 0 indica ativação ou supressão. A parte inferior da imagem mostra a posição dos genes, ainda em barras e com posição igual ao anterior, mas há uma curva que indica a pontuação máxima de enriquecimento, bem como o maior desvio de 0 que é representado pelo pico da curva. Pico a esquerda do gráfico representa enriquecimento positivo e pico a direita indica enriquecimento negativo.

Para os dois grupos principais analisados (V1XV2 e V2XV3) são observados enriquecimento positivo para o conjunto de genes relacionados à cascata de coagulação e ao sistema complemento (Figura 13 e 14).

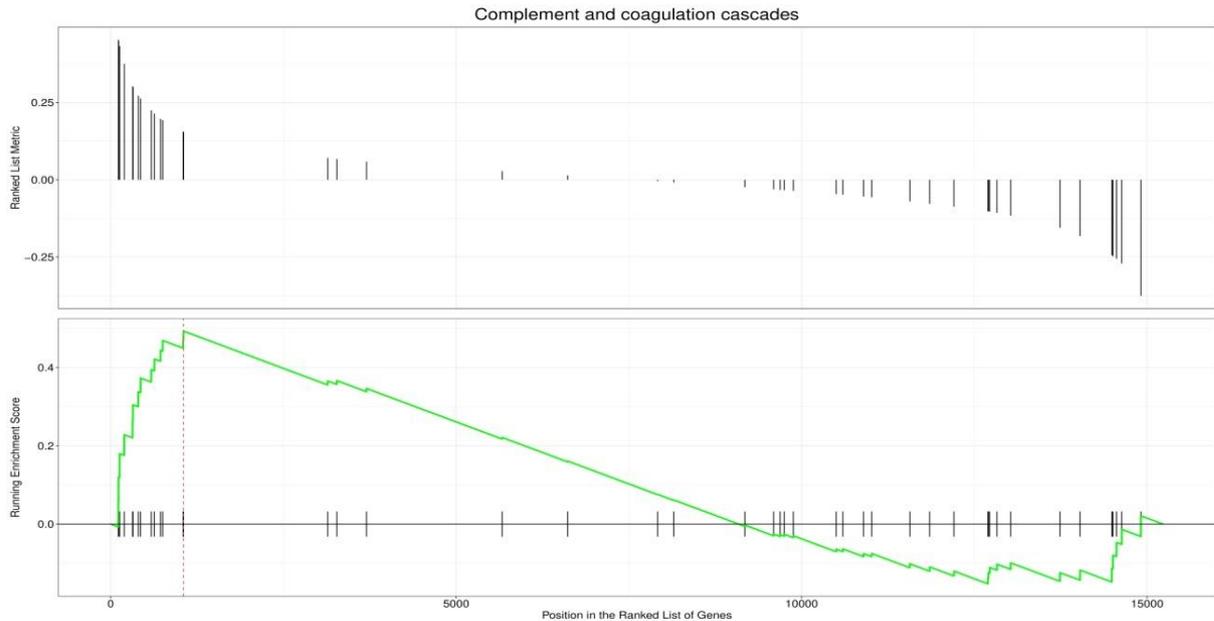


Figura 13: Gsea Plot para cascata de coagulação e sistema complemento V1XV2. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

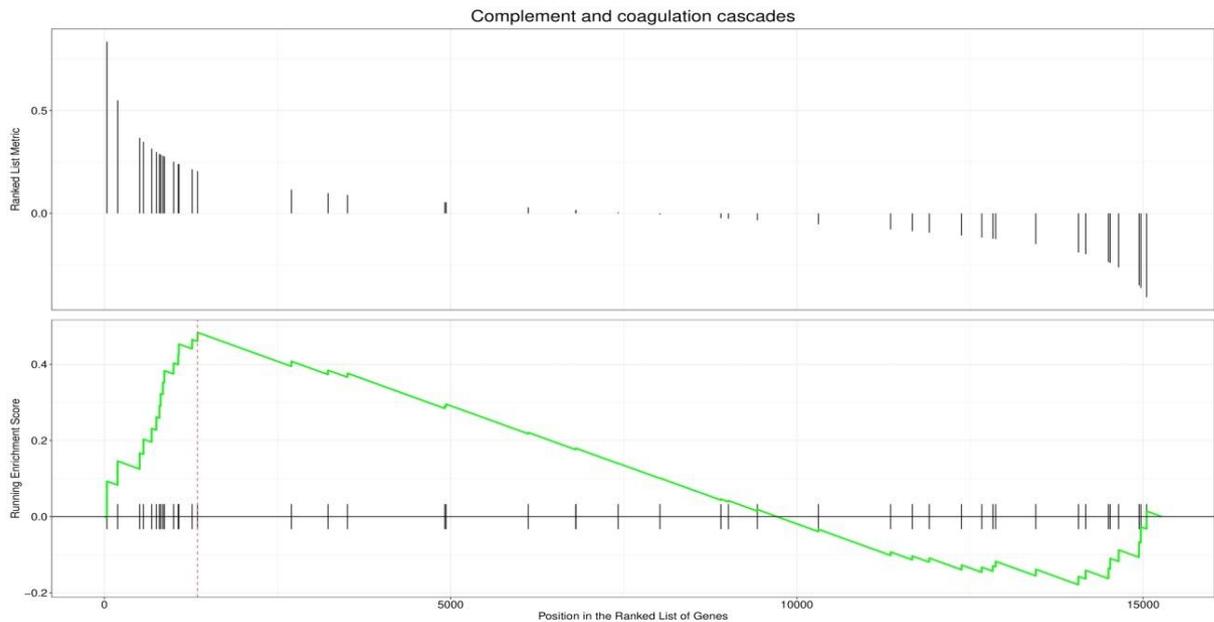


Figura 14: Gsea Plot para cascata de coagulação e sistema complemento V2XV3. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

A via da cascata de coagulação e do sistema complemento apresentou enriquecimento positivo para ambos os grupos experimentais, sendo observados picos altos principalmente em V1XV2. Quanto à quantidade de genes envolvidos o grupo V1XV2 e V2XV3 apresentam quantidade parecida de genes envolvidos na alteração desse conjunto de genes.

Outras vias tiveram resultados semelhantes, mas foram expressas apenas em V2XV3. Dentre essas vias destaca-se a via JAK-STAT (Figura 15).

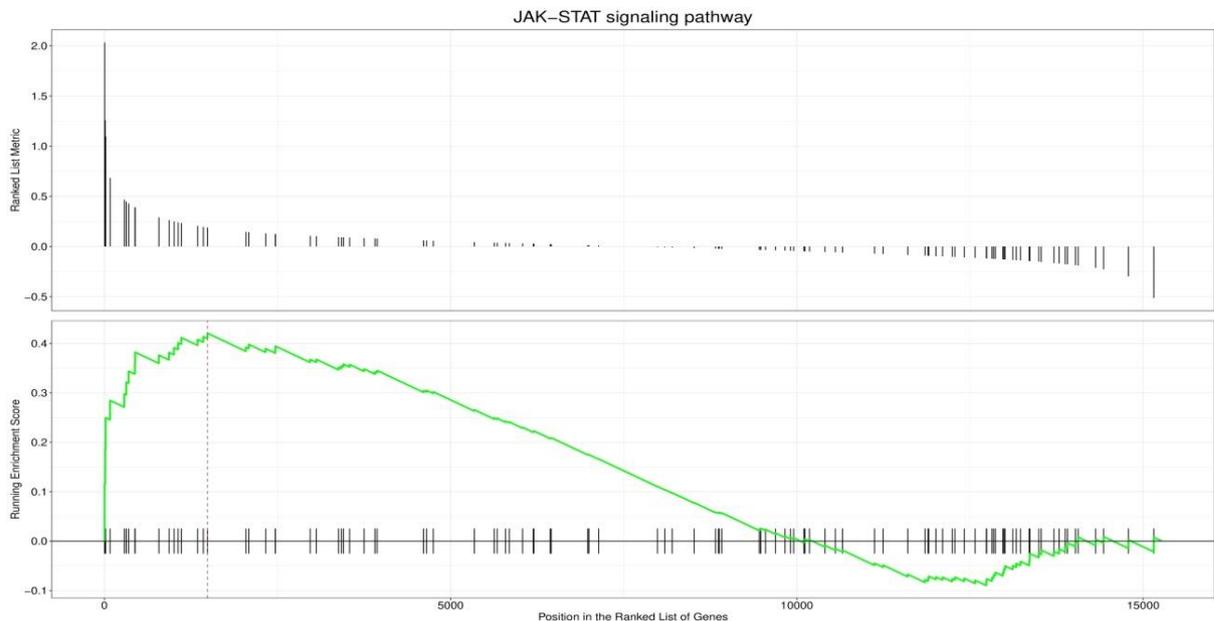


Figura 15: Gsea Plot para via de sinalização JAK-STAT V2XV3. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

A via de sinalização JAK-STAT foi ativada com grande quantidade de genes envolvidos e relacionados ao fenótipo da via. Apresenta genes bem distribuídos na extensão da via e pico máximo de enriquecimento alto.

Outra via com padrões semelhantes entre nesse é a via de sinalização NOD-like (Figura 16).

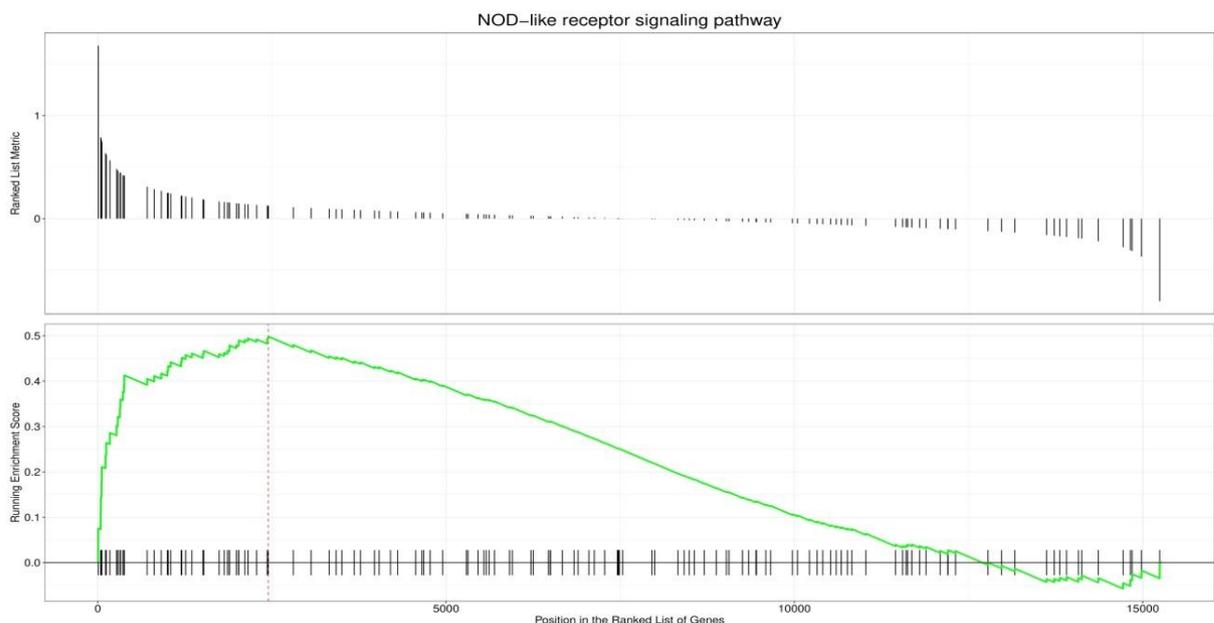


Figura 16: Gsea Plot para via de sinalização NOD-like V2XV3. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

Para a via em questão, observam-se muitos genes envolvidos no fenótipo com enriquecimento positivo. O grupo V2XV3 apresenta grande pico de enriquecimento nessa via, semelhante ao observado na via anterior.

Porém a análise de alguns conjuntos genéticos indicou supressão em algumas vias que são expressos apenas em V2XV3, como a via de sinalização FoxO (Figura 17).

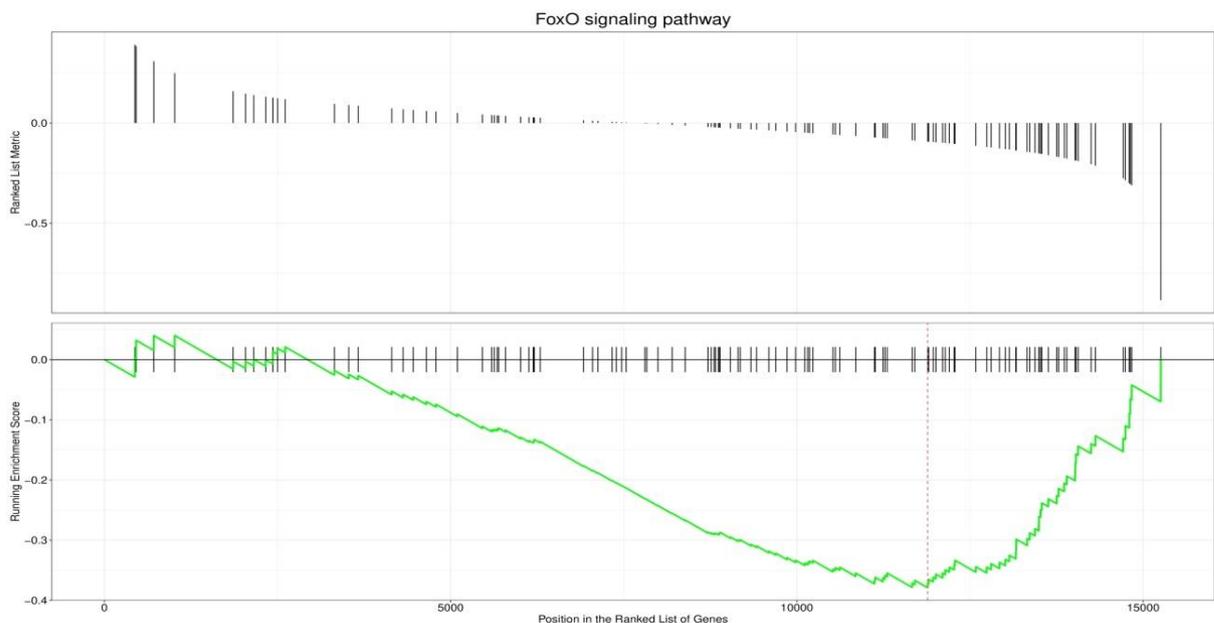


Figura 17: Gsea Plot para via de sinalização FoxO V2XV3. O gráfico mostra enriquecimento negativo do conjunto genético para essa via, com pico abaixo de 0.

Muitos genes estão envolvidos na supressão dessa via. O grupo V2XV3 apresenta pico significativo sendo possível notar que o conjunto genético enriqueceu negativamente essa via de forma acentuada.

Outra via que apresentou enriquecimento negativo foi a via Wnt (Figura 18).

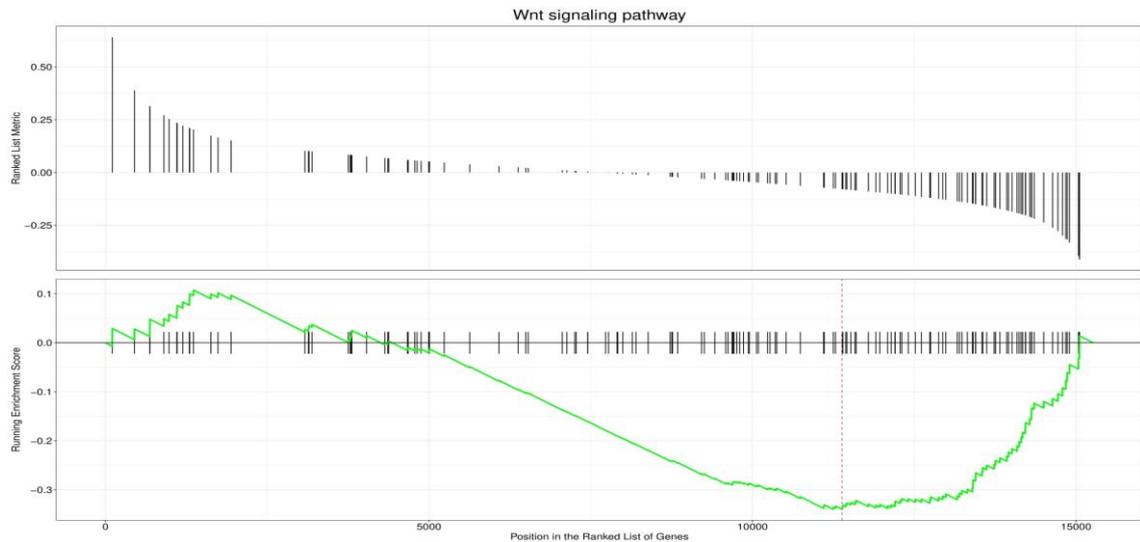


Figura 18: Gsea Plot para via de sinalização Wnt V2XV3. O gráfico mostra enriquecimento negativo do conjunto genético para essa via, com pico abaixo de 0.

De modo parecido à via anterior, muitos genes estão envolvidos nesse enriquecimento e no fenótipo da via. Apresentam valor aproximado de pontuação máxima de enriquecimento com pico negativo, indicando supressão da via. Diferentemente da via anterior, é possível observar alguns genes ativados, mas as perturbações se devem principalmente aos genes expressos negativamente. Portanto no contexto da infecção a via foi reprimida.

Como mencionado, o grupo V1XV3, aqui não representado apresentou alteração nas mesmas vias com características semelhantes à V2XV3. As análises de enriquecimento do conjunto genético desse grupo encontra-se no Anexo A (Figuras 28 a 32).

5.7 Análise de *Splicing* Alternativo

O *splicing* alternativo é um mecanismo capaz de aumentar o número de proteínas expressas a partir de um gene, gerando diversidade genética. Além disso, dependendo do tipo de célula, o *splicing* pode ser regulado diferencialmente (Cooper *et al.*, 2009). Dessa forma, para investigar a variação gênica por meio de *splicing* alternativo no cérebro de camundongos nascidos de mães infectadas por ZIKV, na presença ou ausência de 4G2, foi realizada a análise do mecanismo por *Gene Ontology* representado pelo gráfico gerado pelo programa *Circos* (Circular Genome Data Visualization).

O pacote de *Circos* gera um gráfico com layout circular que mostra a relação entre dados e informações de interesse. No presente estudo, o gráfico gerado mostra a relação entre os transcritos de diferentes isoformas de alguns genes gerados por *splicing* alternativo com as funções desempenhadas por esses transcritos. Essa relação foi descrita em três categorias de *Gene Ontology*: função molecular, processo biológico e componente celular nos grupos V1XV2 e V2XV3.

Foram selecionadas as 50 principais vias alteradas em cada categoria. Além disso, devido à quantidade de transcritos expressos, foi delimitado 10 isoformas por via, pois o pacote de *Circos* permite no máximo 360 termos para formação do gráfico.

A categoria função molecular expressa as atividades elementares de um produto gênico ao nível molecular. Nessa categoria, foram destacadas atividades relacionadas à actina, canais de cálcio, atividade enzimática, formação e manutenção de DNA, atividade de GTP, integridade de histonas e microtúbulos, atividade catalítica, atividade iônica, formação proteica, atividade de RNA e RNA polimerase, canais de zinco, dentre outros. Aproximadamente 238 transcritos foram relacionados à essa categoria em V1XV2 (Figura 19), enquanto que em V2XV3 foram relacionados cerca de 125 transcritos (Figura 22). Porém, as alterações em V1XV2 foram regulares, não apresentando destaque para regulação diferencial em atividades específicas. No entanto, em V2XV3, atividades específicas foram muito reguladas por meio do mecanismo de *splicing*, como ligação de ATP, atividade do DNA, ligação de nucleotídeos, atividade de transferase e principalmente na formação proteica que foi muito regulada. Nesse contexto, transcritos como *Dyrk1a*, *Eif2ak1*, *Ep300*, *Myo5a*, *Ncoa2*, *Ptk2b* e *Rac1* foram mais regulados comparados aos demais, sendo que os genes vinculados a essas isoformas não foram observados na expressão diferencial.

A categoria Processo Biológico caracteriza os processos nas células, órgãos, tecidos e sistemas e o funcionamento de vias que agem para o bom funcionamento do organismo. Foi destacado processo de apoptose, funcionamento do axônio, desenvolvimento do cérebro, atividade celular, processamento de mRNA, desenvolvimento do sistema nervoso, atividade neuronal, transdução de sinal, espermatogênese dentre outros. Em V1XV2 foram observados aproximadamente 261 transcritos, sendo que novamente houve uma regulação uniforme entre as isoformas e processos (Figura 20). Mas em V2XV3, apesar de apresentarem menos

transcritos envolvidos, cerca de 110 (Figura 23), alguns processos foram mais alterados quando comparado ao outro grupo. São eles: transporte de íons, fosforilação, transcrição via RNA, atividade catalítica e transdução de sinal. Mas, diferentemente de V1XV2, V2XV3 apresentou regulação maior de processos relacionados ao sistema nervoso. Além disso, algumas isoformas, como: *Cx3cl1*, *Cxcl12*, *Dyrk1a*, *Ep300*, *ErbB4*, *Lmtk2*, *Ncoa2*, *Ptch1*, *Ptk2b*, *Rac1*, *Tgfbr1* e *Wnk1* foram mais reguladas estando relacionados à vários processos. A maioria dessas isoformas não tiveram seus genes observados na expressão diferencial, mas algumas também aparecem bem reguladas na categoria de função molecular.

Por fim, a categoria componente celular mostra as partes da célula ou ambiente extracelular que estão mais vinculados às isoformas estudadas. Em V1XV2 (Figura 21) cerca de 138 transcritos foram alterados para os seguintes componentes celulares: junção celular, citoplasma, componente integral da membrana, membrana, nucleoplasma, núcleo e membrana plasmática, sendo esses componentes os mais expressos no grupo em questão. De modo semelhante, foram observados também aproximadamente 138 transcritos relacionados aos mesmos componentes celulares descritos em V1XV2, mas com algumas diferenças, como maior expressão em axônio e na região de sinapse, reforçando maior expressão diferencial na presença de 4G2. De modo semelhante as análises anteriores, grande parte dos transcritos dessa categoria não tem genes diferencialmente expressos descritos nas análises anteriores.

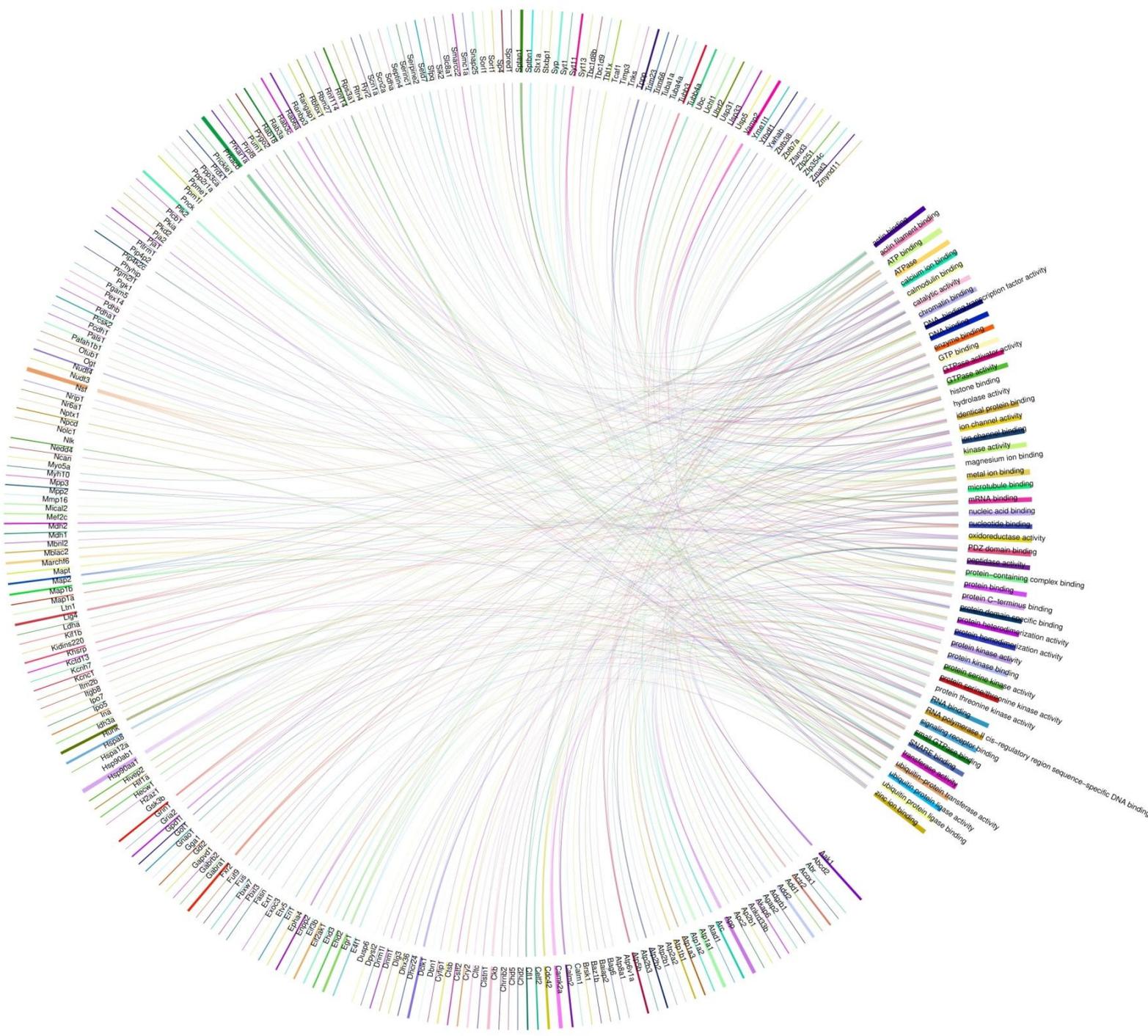


Figura 19: Circos plot V1XV2 – Função Molecular. O gráfico mostra os transcritos gerados por *splicing* alternativo com seus genes de referência associados às funções moleculares mais características desses transcritos em V1XV2.

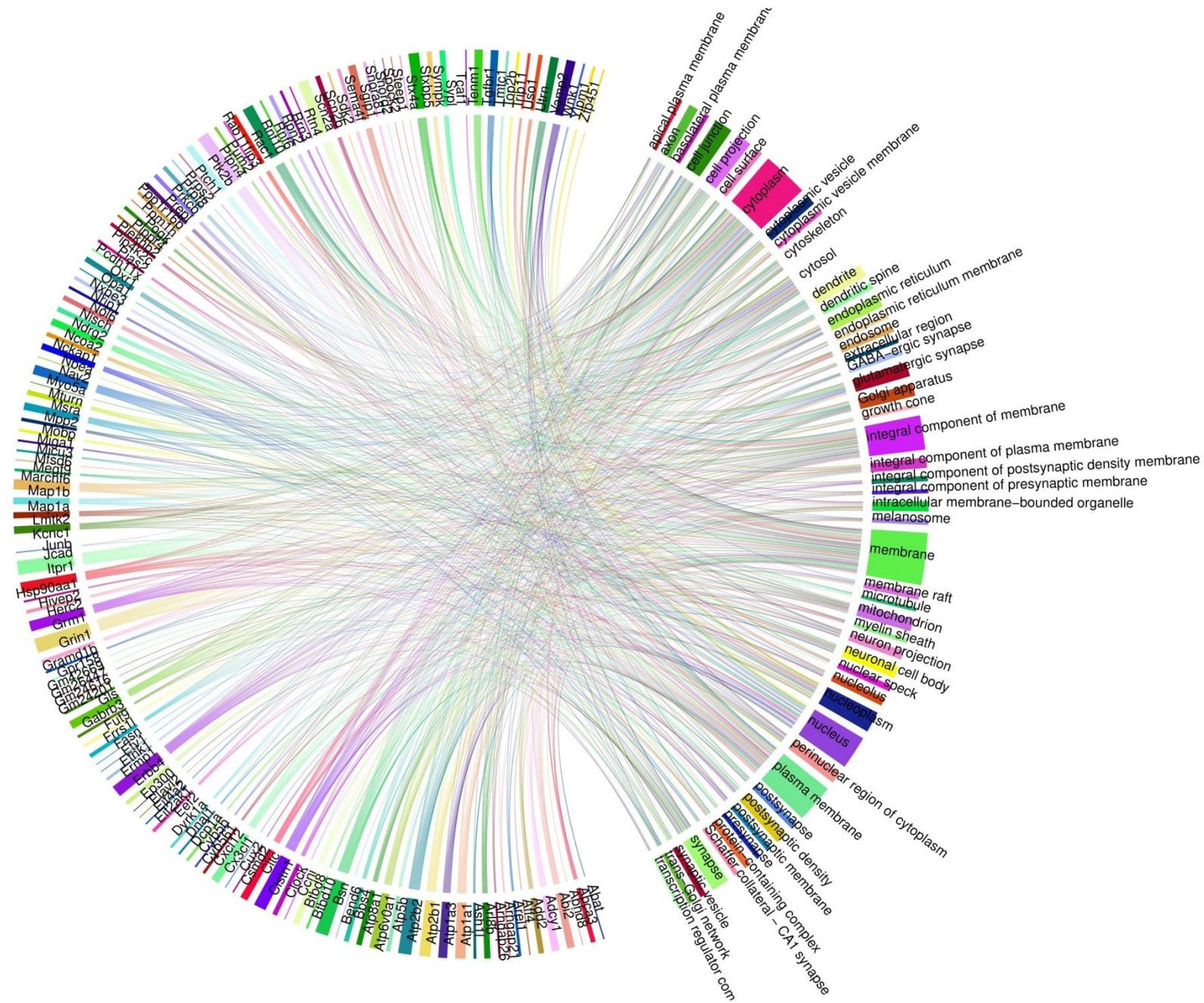


Figura 21: Circos plot V1XV2 – Componente Celular. O gráfico mostra os transcritos gerados por *splicing* alternativo com seus genes de referência associados aos componentes celulares que se relacionam com esses transcritos em V1XV2.

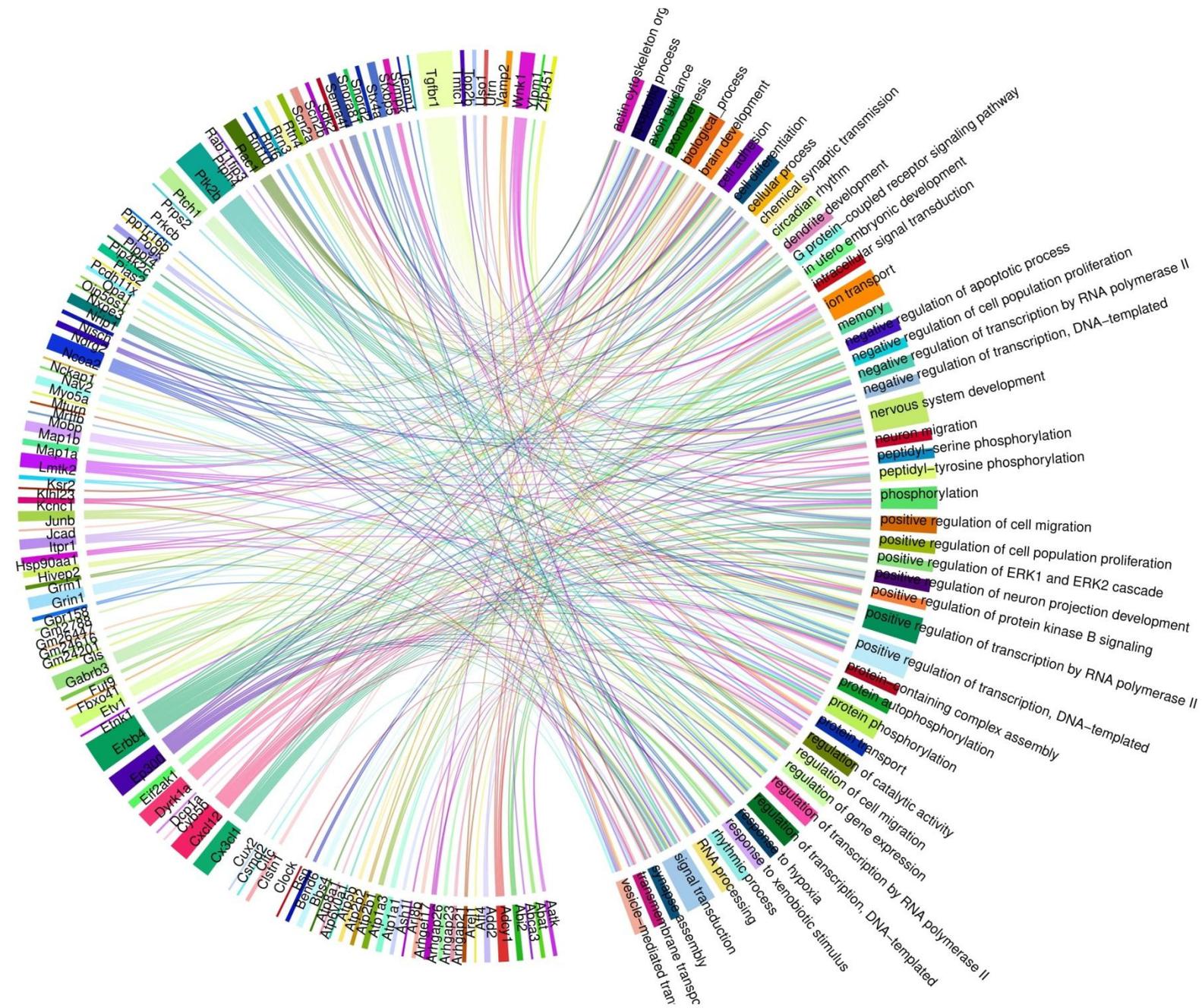


Figura 23: Circos plot V2XV3 – Processo Biológico. O gráfico mostra os transcritos gerados por *splicing* alternativo com seus genes de referência associados aos processos biológicos mais característicos desses transcritos em V2XV3.

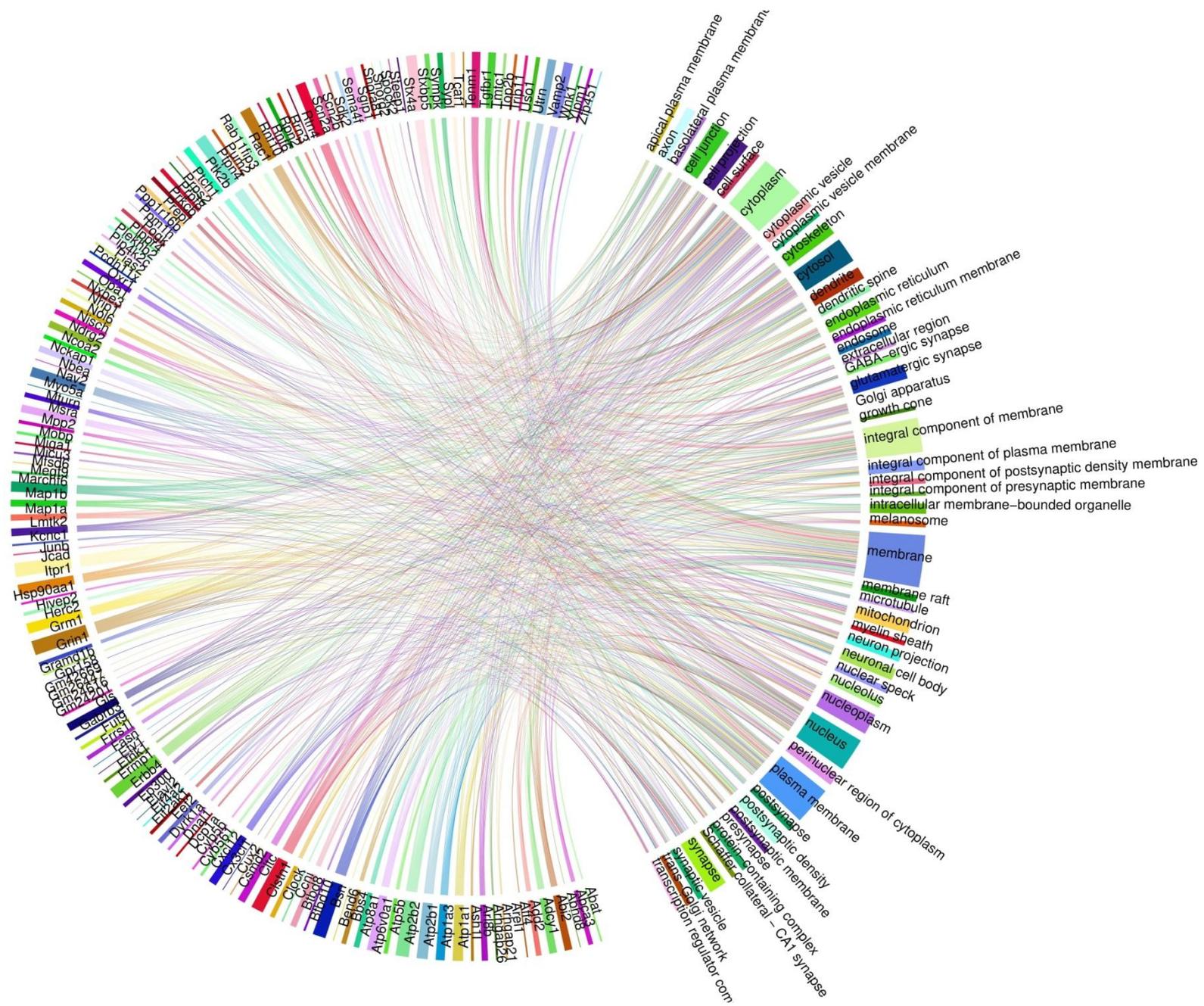


Figura 24: Circos plot V2XV3 – Componente Celular. O gráfico mostra os transcritos gerados por *splicing* alternativo com seus genes de referência associados aos componentes celulares que se relacionam com esses transcritos em V2XV3.

6.0 DISCUSSÃO

A análise do transcriptoma de um organismo permite avaliar simultaneamente a expressão de vários transcritos e desvendar como essa expressão interfere em uma condição fisiológica (Wang *et al.*, 2009). Assim, é possível, através da composição molecular de uma célula ou tecido, compreender o desenvolvimento de doenças quantificando o nível de expressão gênica sob diversas situações, por meio dos genes diferencialmente expressos, que podem ser expressos positivamente ou negativamente (Moreton *et al.*, 2015).

O vírus ZIKV se assemelha muito estruturalmente ao vírus da dengue (DENV), além de serem transmitidos pelo mesmo vetor. Os casos mais graves de SCZ foram observados em regiões endêmicas para DENV, onde provavelmente parte da população teve contato com algum sorotipo desse vírus (Guzman e Harris, 2015). Essa situação pode gerar um fenômeno conhecido como “Intensificação da infecção dependente de anticorpos” (ADE – *Antibody-Dependent Enhancement*), onde durante uma infecção heteróloga, os anticorpos produzidos por DENV desempenham papel inverso ao esperado gerando aumento da infecção causada por ZIKV. Os anticorpos gerados pela primeira infecção geram imunocomplexos com o vírus da nova infecção facilitando a entrada desse vírus na célula hospedeira (Katzelnick *et al.*, 2017).

Muitos estudos revelam o fenômeno de ADE entre ZIKV e DENV, como Zimmerman e colaboradores (2018). Os autores descrevem em modelo *in vitro* que anticorpos específicos para DENV são capazes de aumentar a infecção por ZIKV em macrófagos da placenta por meio da facilitação de entrada do vírus na célula hospedeira conferido pelo complexo ZIKV-anti-DENV. Esses resultados sugerem interferência dos anticorpos anti-DENV na transmissão vertical de ZIKV, o que também foi descrito por Rathore e colaboradores (2019). Foi observado o aumento da transmissão vertical de ZIKV em camundongos com anticorpos para DENV que causou graves má formações cerebrais, como microcefalia grave dependente do receptor Fc neonatal. Em humanos, Wang e colaboradores (2020a) demonstram aumento significativo da infecção por ZIKV no soro de pacientes com infecção primária ou secundária por DENV. Porém, há autores que reportam resultados diferentes que não demonstram o fenômeno de ADE entre ZIKV e DENV. O estudo conduzido por Halai e colaboradores (2017) não evidenciou associação entre os

anticorpos para DENV com a infecção por ZIKV em humanos, não sendo observado aumento da carga viral ou agravamento da patologia de ZIKV. Também já foi sugerido que a infecção por DENV resultam em uma imunidade capaz de reduzir o risco de infecção por ZIKV (Rodriguez-Barraquer *et al.*, 2019).

Dessa forma, o presente estudo buscou compreender, através da análise de transcriptoma a patologia do ZIKV em animais adultos nascidos de mães infectadas, mimetizando uma infecção prévia de outro flavivírus como DENV, sendo utilizado o anticorpo pan-flavivírus 4G2. A análise de genes diferencialmente expressos comparou três grupos experimentais: V1 (grupo controle injetado com PBS), V2 (grupo infectado com ZIKV) e V3 (grupo infectado com ZIKV, mas com administração de 4G2 anterior à infecção). Dentre os genes diferencialmente expressos nos grupos de estudo, a maioria possui função anotada, mas parte desses genes possui função desconhecida ou não anotada.

Mesmo com o avanço tecnológico, muitos organismos possuem genes com função ainda não descrita. Os genes identificados em um genoma são baseados na similaridade com outros genes ou com a significância estatística de uma sequência codificadora de proteína (Rogic *et al.*, 2001). A maioria dos genes é inicialmente identificada como ORF (Open Reading Frame), ou seja, uma janela de leitura aberta que representa a região do DNA que inicia em no códon de iniciação (ATG) e finaliza em um códon de terminação e é traduzida em um polipeptídeo (Doolittle, 1996). Uma ORF não é considerada um gene se não há descrição de um transcrito ou produto proteico derivado dessa sequência (Arnaud e Costanzo, 2005). Em muitos organismos são identificados quantidade alta de ORFs sem função predita, não codificando proteínas com função conhecida (Galperin, 2001). Esses genes não caracterizados e no qual não é possível comparar com algum gene homólogo com função descrita são chamados de genes hipotéticos. Mas há casos em que potenciais genes previstos apresentam homologia com genes já descritos, sendo chamados nesse caso de genes hipotéticos conservados (Sivashankari e Shanmughavel, 2006).

Essa categoria de genes compõe parte do genoma de muitos organismos e permanecem em estudo para descrição da função desses, mesmo com avanços lentos (Sivashankari e Shanmughavel, 2006). Em ZIKV, por exemplo, são encontrados muitos genes hipotéticos. O estudo de Leblanc e Brunet (2020) identificou 4 proteínas alternativas que interagem com o capsídeo viral e com a

proteína NS4A do vírus, através de ORFs com função não descrita. Nesse contexto, foi observado que alguns padrões de anotação do genoma limitam a descrição funcional de muitos genes codificadores de proteínas funcionais e essenciais na patogênese do vírus (Leblanc e Brunet, 2020).

No presente estudo, foram encontrados 24 genes que podem ser classificados como genes hipotéticos, pois não apresentam função descrita nos bancos de dados. Esses genes foram encontrados em todas as condições experimentais (PBS, ZIKV, 4G2+ZIKV) no organismo hospedeiro. De modo semelhante ao trabalho de Leblanc e Brunet (2020), esses genes não descritos podem estar vinculados a funções importantes que podem contribuir na patogênese do ZIKV, mas não foi possível investigar a relação deles com a infecção no momento. Porém, em alguns desses genes foi possível identificar a presença de micro RNAs (miRNAs).

Os miRNAs são uma ampla classe de reguladores de RNA (Carthew e Sontheimer, 2009). São RNAs não codificantes que funcionam como reguladores pós-transcricionais da expressão gênica e direcionam vários transcritos (Bartel, 2004). Os miRNAs são encontrados no genoma de vários organismos e influenciam em processos biológicos como diferenciação celular, proliferação celular, apoptose, metabolismo, sinalização intracelular, movimento celular, imunidade e oncogênese (Park *et al.*, 2009; Shirjang *et al.*, 2019). Isso acontece, pois os miRNAs interagem com regiões do mRNA alvo, como a região 5-UTR ou a região 3-URT, que pode gerar um silenciamento pós-transcricional (Stroynowska-Czerwinska *et al.*, 2014).

Em vírus, como o SARS-CoV-2 foi observado por Karimi e colaboradores (2021) que os miRNAs desse microrganismo influenciam diretamente em vias importantes para a patogênese da doença, como vias imunológicas e de absorção de vitaminas. Já em ZIKV, Islam e colaboradores (2019) identificou através de análise de transcriptoma aproximadamente 50 miRNAs putativos que induziram a regulação negativa de genes envolvidos em vias de sinalização celular, funções neurológicas e desenvolvimento fetal. Assim, esses miRNAs podem ter afetado a função de genes essenciais principalmente para o desenvolvimento fetal e formação do sistema nervoso (Islam *et al.*, 2019). No nosso estudo, foi observado a presença de miRNAs associados a genes como *Gm37795* e *Gm37755*, ambos com função não descrita nos bancos de dados, mas que podem interferir na função de outros genes importantes na patogenia da infecção.

No grupo V1XV2, que comparou animais do grupo controle injetados com PBS e animais infectados por ZIKV, além dos genes sem função, o grupo apresentou 4 genes reprimidos com funções diversas. O primeiro gene desse grupo é o gene *Slc9a4*, que está envolvido na regulação do pH e na absorção de sódio (Gawenis *et al.*, 2005). No ciclo viral do ZIKV, o pH é fator importante para que todas as fases sejam concluídas adequadamente. Durante a fusão das membranas endossomal e viral é necessário pH ácido, mas além disso, mudanças no pH são importantes para o processo de liberação do vírus maduro da célula e para a integridade desse vírus no ambiente extracelular (Haslwanter *et al.*, 2017). O gene *Slc9a4* também funciona como transportador de glicose, ácidos orgânicos, compostos de amina e sais biliares, sendo possivelmente essencial no papel de moléculas básicas na diferenciação de células imunes (Tan *et al.*, 2020). Assim, a supressão desse gene pode afetar a homeostase do organismo infectado e favorecer a infecção pelo vírus.

O gene *Prss56* está associado à formação ocular e a doenças oftalmológicas (Koli *et al.*, 2021). Anormalidades oftalmológicas são recorrentes na prole nascida de mães infectadas por ZIKV, sendo observadas alterações na pressão intraocular e na predisposição a outras doenças como miopia e hipermetrofia (Ventura *et al.*, 2016). Assim, ao ser reprimido, o gene *Prss56* afeta diretamente a formação do olho do indivíduo, favorecendo o comprometimento desse órgão.

O gene *C1ql2* tem como função a regulação do número de sinapses excitatórias que são formadas nos neurônios do hipocampo (Sigin *et al.*, 2020). A rede sináptica no hipocampo é regulada por receptores pós-sinápticos de glutamato do tipo cainato, por meio de cinética de canal lento. Esses receptores são associados ao gene *C1ql2* que funciona em associação ao gene *C1ql3* (Matsuda *et al.*, 2016). As proteínas oriundas desses genes agem como organizadores celulares para recrutar complexos formados pelos receptores de glutamato funcionais para os neurônios e garantir o funcionamento adequado dessas células (Matsuda *et al.*, 2016). Um estudo conduzido por Bobermin e colaboradores (2020) demonstrou que alterações que afetam o funcionamento do hipocampo durante a infecção por ZIKV pode acelerar o surgimento de doenças degenerativas como Alzheimer. Isso porque rapidamente o vírus gera alterações bioquímicas, celulares e moleculares nas células do hipocampo durante o processo inflamatório (Bobermin *et al.*, 2020). Desse modo, a supressão do gene *C1ql2* impede a formação de proteínas

essenciais para o funcionamento adequado da estrutura cerebral, agravando e colaborando para casos de microcefalia por exemplo.

Por fim, o gene *Scgn*, que teve maior nível de supressão no grupo experimental em questão, produz proteínas que interagem seletivamente e não covalentemente com íons de cálcio e tem expressão em tecidos endócrinos que inclui regiões distintas do cérebro e células neuroendócrinas do trato gastrointestinal e pâncreas (Wagner *et al.*, 2000). O secretagoin, codificado pelo gene em questão interage com o complexo SNARE que é um complexo essencial para ancoragem de vesículas secretoras com membranas de células alvo, principalmente no intestino. Alterações nesse complexo facilitam a entrada de patógenos nas células desse órgão (Sifuentes-Dominguez *et al.*, 2019). O gene também atua em processos como regulação do ciclo celular, apoptose, transcrição, processos de desenvolvimento e controle de secreção. Portanto, mutações e alterações na expressão de *Scgn* podem levar a uma vulnerabilidade de alguns órgãos frente à infecção de patógenos (Bai *et al.*, 2014). No caso de uma infecção por ZIKV, modificações gênicas em tecidos cerebrais podem estar vinculadas a esse gene, que pode favorecer a multiplicação viral.

Desse modo, os genes expressos negativamente em V1XV2, apesar possuírem funções distintas, mostram-se importantes na patogenia do ZIKV, seja influenciando em processos de formação e funcionamento de órgãos e tecidos ou atuando em aspectos que fragilizam a célula hospedeira e permite a entrada e replicação viral.

Já o grupo V2XV3 que comparou animais infectados por ZIKV e animais tratados com 4G2 previamente à infecção por ZIKV, apresentou 18 genes exclusivamente expressos nesse grupo experimental. Quanto aos genes ativados, foram observados 8 genes expressos positivamente com função descrita, sendo 3 relacionados ao sistema imune: *Lilra5*, *Il20ra* e *Gm12250* sendo esse último ativado por IFN- γ .

O gene *Lilra5* é expresso por neutrófilos e monócitos e possui papel na regulação de produção de IL-6, IL-10, IL-12, IL-13, cascata MAPK e TNF, sendo, portanto, essencial na inflamação (Truong *et al.*, 2020). A IL-10 e o IFN- γ atuam principalmente na regulação positiva do gene, enquanto que TNF atua ao gene na regulação negativa desse. Em conjunto esses fatores são essenciais no escore de uma doença infecciosa (Mitchell *et al.*, 2008). Já o gene *Il20ra* codifica um receptor

de interleucina e é expresso em vários tecidos, mas especialmente em células epiteliais (Gao *et al.*, 2021). Sua expressão forma um receptor funcional que é heterodimerizado com a IL-20, estimulando células imunes a produzir outras citocinas com papel essencial na regulação da imunidade inata e na reparação de tecidos (Li *et al.*, 2021).

Desse modo, observa-se que os genes ativados em V2XV3 estão relacionados à produção de citocinas. Estudos indicam que na infecção por ZIKV a produção de citocinas pró-inflamatórias é elevada, estando vinculadas à atividade de linfócitos T e B e ativando a resposta imune celular e humoral (Tappe *et al.*, 2016). Na fase aguda da infecção há o aumento de IL-1 β , IL-6, IL-10, IL-13, CXCL10, CCL5, CCL3, VEGF, IL-2, IL-4, IL-9 e IL-17, sendo que na fase de convalescência, muitas dessas citocinas continuam aumentadas (Maharajan *et al.*, 2016). Além disso, Frumence e colaboradores (2016) identificaram em sua pesquisa que a infecção por ZIKV em células pulmonares induziu rápida produção de IL-1 β , IL-6, IL-8, CCL2 e IFN- β que colaborou para a sobrevivência de células infectadas por maior tempo. Portanto, ativação dos genes observados evidencia a resposta inflamatória frente ao vírus, tanto em uma infecção sem precedentes quanto quando há uma infecção prévia por outros flavivírus.

Os demais genes ativados estão relacionados à manutenção da célula como o gene *Gsx1* que atua como fator de transcrição que se liga à sequência de DNA 5'-GC [TA] [AC] ATTA [GA] -3' (Mutsuga *et al.*, 2001). Além disso, o gene está envolvido em processos de formação de tecidos e órgãos, assim como *Avp* que atua na atividade e formação dos rins (Gaudet *et al.*, 2011). Já os outros genes estão relacionados a outros processos biológicos, como absorção de cálcio e modulação de morfina (Askwith *et al.*, 2000). Então, além de genes intimamente relacionados à resposta imune do hospedeiro, observa-se a alteração e desequilíbrio de diversos outros sistemas do corpo. Isso pode levar a uma maior susceptibilidade à doença agravando os casos principalmente quando há outros fatores associados.

Enquanto isso, os genes expressos negativamente em V2XV3 (*Fos*, *Egr2*, *Ccn1*) estão vinculados à supressão da maquinaria celular. Ambos atuam na proliferação celular, processo de apoptose e diferenciação celular. *Fos* e *Egr2* estão especialmente relacionados também com a morfogênese cerebral, no desenvolvimento da caixa craniana e nos estímulos nervosos pré e pós-nascimento (David *et al.*, 2005; Gimferrer *et al.*, 2011). Isso corrobora com as manifestações

clínicas da SCZ, principalmente em recém-nascidos com microcefalia. A supressão de genes envolvidos na morfogênese cerebral compromete o órgão e pode ser ainda mais problemática durante uma infecção cruzada, já que esses genes aparecem prioritariamente no grupo tratado com 4G2.

Como observado no Diagrama de Venn, os grupos V1XV3 e V2XV3 compartilham 14 genes, expressos em ambos os casos. Desses genes 2 não apresentam função descrita. Quanto aos demais genes, 9 foram regulados positivamente em ambos os grupos e 3 foram regulados negativamente em ambos os grupos. Curiosamente, todos os genes ativados participam de algum processo imunológico, enquanto que todos os genes suprimidos estão vinculados a processos celulares. A seguir, serão discutidos esses genes comuns aos dois grupos experimentais.

O gene *Ifi2712a* está envolvido na regulação negativa induzida por interferon da atividade transcricional de NR4A1, NR4A2 e NR4A3 por meio do aumento da exportação nuclear mediada por XPO1 de receptores nucleares (Labrada *et al.*, 2002). Também é um gene muito expresso na atividade de células microgliais e pode estar relacionado à regulação da inflamação nessas células (Kim *et al.*, 2021). Além disso, é ativo em infecções por flavivírus. Animais deficientes para esse gene apresentam títulos virais aumentados e alto padrão de morte celular neuronal, associado ao fenótipo de morte celular e comprometimento de tecidos na infecção por WNV (Lucas *et al.*, 2015). Da mesma forma, outros genes da família *Ifi*, como *Ifi209* e *Ifi204*, ativados em ambos os grupos, funcionam pela interação com interferon na resposta imune inata, sendo que estudos recentes relatam mesma interação observada em WNV com o vírus Chikungunya (CHIKV) e ZIKV (Wichit *et al.*, 2019).

Outros genes ativados como *Gm4951*, *H2-Q6* e *Nlrp1c-ps* participam da resposta imune recrutando mediadores inflamatórios, recrutamento de células imune e apresentação de antígeno (Burckstummer *et al.*, 2009; Gaudet *et al.*, 2011). Os demais genes, *Zbp1*, *Lgals3bp* e *Tgtp1*, são ativados durante infecção de patógenos, sendo o *Zbp1* específico para infecção contra flavivírus, pois é capaz de reconhecer e se ligar a estruturas do RNA viral (Clarke *et al.*, 2014).

Quanto aos genes reprimidos compartilhados entre os grupos (*Depp*, *Hmcn1*, *Magix*), observa-se que esses estão relacionados ao ciclo celular e morfogênese. *Hmcn1*, por exemplo, atua em etapas da embriogênese e na diferenciação celular

durante esse processo enquanto *Depp1* é modulador de autofagia (Stepp *et al.*, 2014). Dessa forma, é possível observar uma supressão que interfere diretamente no desenvolvimento gestacional, o que colabora com o agravamento de casos de SCZ quando considerado também casos de AIM.

Após análise funcional dos genes expressos exclusivamente em cada grupo experimental e dos genes compartilhados entre V1XV3 e V2XV3, foi verificado que na presença de 4G2, a infecção é mais acentuada e o prejuízo celular e morfológico também é maior. Isso foi observado principalmente no grupo tratado com 4G2 e nos genes compartilhados entre os grupos. Nesse caso a maior parte dos genes ativados são genes relacionados à resposta imune do hospedeiro, o que indica uma tentativa do organismo em combater a infecção e impedir a replicação viral. Em contrapartida, os genes suprimidos, em grande parte se relacionam com processos celulares e morfológicos, o que corrobora com a patogenia da doença. O prejuízo celular, principalmente em genes relacionados ao sistema nervoso contribui para várias malformações observadas na SCZ, principalmente microcefalia. A atividade inadequada desses sistemas inviabiliza um bom desenvolvimento embrionário e agrava as manifestações clínicas da síndrome. Quando observado o grupo apenas infectado, V2 é possível ver a manifestação do sistema imune e o comprometimento de algumas vias, mas na presença de 4G2 essa manifestação foi muito maior em questão de genes diferencialmente expressos, tanto positivos quanto negativos, levando a perceber a gravidade de uma infecção cruzada em regiões endêmicas para DENV.

Essas observações se assemelham aos resultados descritos por Camargos e colaboradores (2019). O estudo investigou o fenômeno de ADE na infecção por ZIKV em modelo experimental no qual os camundongos recebiam uma dose subneutralizante de 4G2, 24 horas antes da infecção, simulando uma infecção prévia por outro flavivírus, assim como no presente estudo. Foi observada menor viabilidade fetal no grupo tratado com o anticorpo, bem como diminuição no peso da placenta e uma diminuição acentuada do peso corporal dos embriões. Também foi detectado número maior de amostras de RNA viral no cérebro dos embriões no qual as mães foram tratadas com 4G2 (Camargos *et al.*, 2019). Essas observações podem estar relacionadas à hiporresponsividade inflamatória na placenta desses animais. Esses resultados vão ao encontro com a análise de transcriptoma aqui descrito que relata alteração de expressão de genes principalmente de vias

imunológicas e de formação tecidual. Quando avaliado as anormalidades neuropatológicas da prole de mães tratadas ou não com 4G2 foi observada diminuição no número de neurônios no córtex da prole com 12 semanas no grupo infectado e tratado, o que corrobora com a análise de transcriptoma realizada com os mesmo parâmetros e no qual apresentou expressão negativa de genes relacionados à morfogênese do sistema nervoso. Também foi descrito alteração na morfogênese de outros órgãos como o olho, no qual a presença do anticorpo causou uma pressão intraocular elevada e nos testículos, que apresentaram redução do número de espermátides redondas por célula de Sertoli (Camargos *et al.*, 2019).

O enriquecimento de via expressos em duas formas de gráfico (*Dot plot* e *Ridge plot*) mostraram resultados que reafirmam as observações já descritas. Em V1XV2 as vias alteradas tanto para cima quanto para baixo podem ser relacionadas às funções dos genes suprimidos nesse grupo, estando envolvidas no ciclo celular, morfogênese e manutenção da homeostase. De forma semelhante também ao observado na análise funcional, o enriquecimento de via em V2XV3 consolida os aspectos imunológicos e celulares observados nesses grupos. Grande parte das vias ativadas em ambos os grupos são vias relacionadas ao sistema imune, à ativação e produção de citocinas, resposta imune inata, defesa contra patógenos. Nesse caso, essas vias foram modificadas em pelo menos 60% de sua extensão e apresentaram altos parâmetros estatísticos que confirmam a super expressão desses mecanismos. Ainda reforçando os dados funcionais, as vias suprimidas também no grupo em questão estão intimamente ligadas à atividade celular e morfogênese, sendo destacado a neuromorfogênese e o desenvolvimento do sistema cardíaco. Esses dados reforçam o observado quanto à manifestação do sistema imune frente ao ZIKV, a tentativa de conter a infecção por parte do organismo hospedeiro e exacerbação da atividade imunológica que pode estar associada tanto à ADE quanto AIM; assim como a supressão de mecanismos de desenvolvimento elucidada a gravidade da patogenia expressa em fenótipos de malformações observadas na SCZ.

Ainda quanto às principais vias alteradas nos grupos experimentais, destacamos algumas dessas que tiveram enriquecimento do conjunto genético interessante. A via da cascata de coagulação e sistema complemento foi ativada com vários genes envolvidos nessa ativação em V1XV2 e V2XV3.

Muitos vírus causam um desequilíbrio na homeostasia e na coagulação que podem levar a casos de síndrome hemolítica urêmica, coagulação intravascular disseminada, hemorragias e tromboembolismo venoso (Lopes, 2011; Almeida *et al.*, 2018). Em ZIKV, foram relatados casos graves de trombocitopenias com alguns casos hemorrágicos associados ao quadro (KARIMI *et al.*, 2016; SHARP *et al.*, 2016). Sarmiento-Ospina e colaboradores (2016) relataram casos hemorrágicos fatais em pacientes RT-PCR positivos para ZIKV. Além disso, uma criança apresentou diversos sinais clínicos relacionados ao funcionamento da cascata de coagulação (Sarmiento-Ospina *et al.*, 2016). Vale ressaltar que a trombina, presente na coagulação, estimula a inflamação e a produção de citocinas pró-inflamatórias, além de colaborar com o processo de clivagem das proteínas C3 e C5 do sistema complemento (Opal, 2003). Assim, o enriquecimento dessa via é esperado em casos graves de infecção causada por ZIKV, pois estão intimamente ligados aos processos imunológicos do organismo.

Outras vias imunes foram expressas prioritariamente no grupo V2XV3, que reafirma a acentuação da resposta imune na presença de 4G2. Uma dessas vias é a via de sinalização Jak-STAT. Essa via atua como regulador chave da sinalização de interferon e citocinas em mamíferos, mas também atua regulando efeitos pleiotrópicos de diferenciação e crescimento, proliferação celular e respostas imunológicas (Shuai *et al.*, 1994; Arbouzova e Zeidler, 2006). É elucidada a interação dos flavivírus com reguladores dessa via em vários estudos, sendo que a via exerce atividade antiviral (Grant *et al.*, 2016; Best, 2017, Harsh *et al.*, 2020). Em ZIKV, a via Jak-STAT também é relacionada à contenção da replicação viral (Angleró-Rodríguez *et al.*, 2017). Mas, Wang e colaboradores (2020b) mostraram que a estimulação de IFN β associado a genes que interagem com a via podem causar uma superexpressão de Jak-STAT que quando ativada além do comum pode favorecer a sobrevivência do vírus e a sua replicação no organismo hospedeiro. Outra via ativada no mesmo contexto foi a via NOD-Like. É reportada que na infecção por ZIKV a ativação do inflamassoma do receptor NOD e a secreção de IL-1 β , desencadeia resposta inflamatória em diversos órgãos podendo lesionar as células que os constitui de forma irreparável (Liu *et al.*, 2019b). Em conjunto, esses resultados reforçam a hipótese de uma resposta inflamatória mais acentuada no contexto de ADE.

Porém, além de vias imunológicas ativadas, foram observados repressão de vias imunes também V2XV3, como as vias FoxO e Wnt. As proteínas da via FoxO atuam em distúrbios degenerativos e nos processos de perda cognitiva, distúrbios comportamentais, lesão neuronal e doenças vasculares (Sangaletti *et al.*, 2017). No contexto de apoptose, durante uma infecção, por exemplo, fatores de transcrição dessa via são capazes de controlar reguladores da via p53, causando um desequilíbrio que leva à degeneração de células neuronais (Sanphui *et al.*, 2020). Em ZIKV, o comprometimento no neurodesenvolvimento foi associado com essa via que gera um aumento da expressão de receptor 3 Toll-Like induzido pela superexpressão de fatores de transcrição de FoxO (Ojha *et al.*, 2019). Enquanto isso, a via Wnt é uma via de sinalização importante no desenvolvimento do indivíduo, interferindo diretamente no desenvolvimento embrionário e em processo de diferenciação, migração, polarização celular e renovação de células tronco (Buechling e Boutros, 2011). A alteração dessa via na infecção pelo vírus ZIKV é recorrente de acordo com Bhagat e colaboradores (2018) que mostraram em células tronco neurais que a proteína E viral modifica a expressão de miRNAs reguladores de Wnt. Esse perfil de expressão e modificação detectado em células tronco também são observados em células de tumores na presença de ZIKV (Kaid *et al.*, 2018). Portanto, é observado supressão em vias que firmam os dados funcionais dos genes e revelam alteração do sistema imune e comprometimento da formação do indivíduo em situações com fatores de agravamento como a presença de 4G2, já que essas modificações não foram observadas em V1XV2. Assim, o desequilíbrio do controle inato do hospedeiro associado à repressão de FoxO e Wnt pode impactar significativamente no desenvolvimento de SCZ.

No entanto, apesar de um número reduzido de genes diferencialmente expressos nos grupos analisado, a análise de *splicing* mostrou que além dos genes descritos e que impactam em muitas vias imunológicas e morfológicas, muitos transcritos de diferentes isoformas gênicas também estão envolvido na patogênese de ZIKV. O *splicing* alternativo é um mecanismo de eucariotos no qual há o aumento do número de proteínas expressas por meio de um gene único (Nilsen e Graveley, 2010). Esse mecanismo é essencial para a diversidade proteica, além de ser um fator que explica o contraponto entre a quantidade pequena de genes definidos pelo sequenciamento do genoma humano, com a complexidade do organismo humano (Venter *et al.*, 2001). Durante o *splicing*, são removidos ou incluídos alternativamente

diferentes introns e exons durante o processamento do RNA, onde também ocorre a seleção dos sítios 5' e 3' de um intron, levando a mudanças no comprimento do exon (Goldstrohm *et al.*, 2001).

Muitos vírus que infectam células eucarióticas estão desenvolvendo mecanismos para diversificar sua expressão gênica através do mecanismo de *splicing* de RNA, como os vírus da imunodeficiência humana (HIV) que a partir de sítios 5' e 3' para gerar cerca de 40 isoformas diferentes de transcritos na célula infectada (Purcelli e Martin, 1993). Processo semelhante acontece com o papilomavírus e com vírus Epstein-Barr (EBV) que usa o *splicing* para beneficiar seu ciclo de multiplicação (Zheng, 2004; Verma *et al.*, 2010). Em Flavivírus, o processo de *splicing* alternativo está intimamente ligado à proteína não estrutural NS5 que tem papel fundamental no complexo de replicação viral e interage com várias proteínas do hospedeiro (Mairiang *et al.*, 2013). Isso já foi reportado para o vírus DENV e YFV, sendo o esse último capaz de interagir com proteínas como SNF5 e p54, além de outros transcritos envolvidos no processo de transcrição, tradução e regulação da resposta imune inflamatória (Madrid, 2007). Em ZIKV, já foi observada a interação de transcritos gerados por *splicing* do gene SRSF1 com o complexo DNA-PK presente no núcleo celular do hospedeiro. Essa interação impacta no reparo do DNA e na regulação do metabolismo de RNA (Shao *et al.*, 2020).

No presente estudo, foi observada quantidade de transcritos de diferentes isoformas superior à quantidade de genes diferencialmente expressos. Mas foram observados muitos transcritos relacionados ao desenvolvimento do sistema nervoso e da manutenção de células nervosas nas diferentes categorias de *Gene Ontology*, o que reafirma os resultados de análises de vias que indicam prejuízo em processos morfológicos no grupo V2XV3. Isso também corrobora com os estudos (Mairiang *et al.*, 2013; Shao *et al.*, 2020) que indicam a utilização por parte do vírus dos transcritos gerados por *splicing* para favorecer a multiplicação viral, e considerando que o ZIKV possui neurotropismo, as células mais afetadas e com maior prejuízo são as células do sistema nervoso. Foi observado aqui que na presença de 4G2, a regulação da expressão dessas isoformas é mais acentuada, indicando maiores danos no desenvolvimento neuronal. Dessa forma, a análise do *splicing* alternativo colabora na compreensão da patogenia já que parte do fenótipo da infecção, com alterações neurológicas estão vinculadas a proteínas originadas por diferentes isoformas de um gene.

Em conjunto, esses resultados corroboram com os resultados de Camargos (2020), onde foram observadas malformações associadas à infecção por ZIKV da fase embrionária à fase adulta da prole nascida de mães infectadas, que foram acentuadas em camundongos nascidos de mães tratadas com 4G2 e considerando também uma AIM exacerbada nesse grupo. A análise de transcriptoma aqui demonstrada possibilitou identificar de forma gênica a relação da patogenia da doença com o fenótipo observado. Foi demonstrada uma regulação positiva de genes e vias que impactam na resposta imunológica do hospedeiro e regulação negativa de genes determinantes na morfogênese, revelando o trabalho do organismo em combater a infecção e a atuação do vírus no desenvolvimento, principalmente embrionário, que acarreta nas malformações características de SCZ.

7.0 CONCLUSÃO

Os resultados do trabalho demonstraram pela análise de transcriptoma da prole adulta nascida de mães infectadas por ZIKV que a infecção congênita do ZIKV produz efeitos exacerbados associados ao fenômeno de ADE. É observada a manifestação do sistema imunológico no combate da infecção, assim como o prejuízo na morfogênese de diversos órgãos e sistemas, mas principalmente no sistema nervoso, sendo evidenciado principalmente pelo processo de *splicing* alternativo. Desse modo, durante a fase gestacional, além do fenômeno de ADE, pode ocorrer uma AIM exacerbada que induz a expressão positiva de mecanismos imunes, mas que não foi capaz de conter consequências neurológicas a longo prazo nesse modelo em camundongos tratados com o anticorpo pan-flavivírus 4G2. Assim, os resultados sugerem que ADE associado à AIM contribui para a patogênese da Síndrome Congênita do Zika, agravando as manifestações clínicas e alterações neurológicas.

REFERÊNCIAS

- AGRELLI, A.; MOURA, R. R.; CROVELLA, S.; BRANDÃO, L. A. C. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infection, Genetics and Evolution* 69, 22–29. 2019.
- ALHAMDOOSH, M.; LAW, C. W.; TIAN, L.; SHERIDAN, J. M.; NG, M.; RITCHIE, M. E. Easy and efficient ensemble gene set testing with EGSEA. *F1000Research*, v. 6, p. 2010, nov. 2017.
- ALMEIDA, M.; *et al.* Thrombotic thrombocytopenic purpura associated with dengue and chikungunya virus coinfection: case report during an epidemic period. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo*, n. April, p. 11–14. 2018.
- ANDERS, S.; PYL, P. T.; HUBER, W. HTSeq--a Python framework to work with highthroughput sequencing data. *Bioinformatics*, v. 31, n. 2, p. 166–169, jan. 2015.
- ANGLERÓ-RODRÍGUEZ, Y.; MACLEOD, H. J.; KANG, S.; *et al.* Aedes aegypti Molecular Responses to Zika Virus: Modulation of Infection by the Toll and Jak/Stat Immune Pathways and Virus Host Factors. *Front. Microbiol.* <https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.02050>. 2017.
- ARBOUZOVA, N. I.; ZEIDLER, M. P. JAK/STAT signalling in Drosophila: insights into conserved regulatory and cellular functions. *Development* 133, 2605-2616. 2006.
- ARNAUD, M. B.; COSTANZO, M.C. The Candida Genome Database (CGD), a community resource for Candida albicans gene and protein information, *Nucleic Acids Research*, 33, D358-D363. 2005.
- ASKWITH, C.C.; *et al.* Neuropeptide FF and FMRFamide potentiate acid-evoked currents from sensory neurons and proton-gated DEG/ENaC channels. *Neuron* 26:133-141. 2000.
- BAI, Y.; SUN, Y.; PENG, J.; *et al.* Overexpression of secretagoin inhibits cell apoptosis and induces chemoresistance in small cell lung cancer under the regulation of miR-494. *Oncotarget*. 5(17): 7760–7775. 2014.
- BARBA, M.; CZOSNEK, H.; HADIDI, A. Historical perspective, development and applications of next-generation sequencing in plant virology. *Viruses*, v. 6, n. 1, p. 106–136, jan. 2014.
- BARDINA, S. V.; BUNDUC, P.; TRIPATHI, S.; *et al.* Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting ant flavivirus immunity. *Science (New York, N.Y.)* 356: 175–180. 2017.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. *Cell* 116, 281–297. 2004.
- BASU, R.; TUMBAN, E. Zika Virus on a Spreading Spree: what we now know that was unknown in the 1950's. *Viol. J.* 13, 165. <https://doi.org/10.1186/s12985-016-0623-2>. 2016.

BELTRAME, G. F.; *et al.* Patogênese da microcefalia induzida pelo vírus zika: uma revisão de literatura. Revista Inspirar, Movimento & Saúde. Edição 48 - Volume 18 - Número 4. 2018.

BEST, S. M. The many faces of the flavivirus NS5 protein in antagonism of type I interferon signaling. J. Virol. 91, e01970-16. 2017.

BEYS-DA-SILVA, W. O.; QUINCOZES-SANTOS, A.; TURETA, E. F.; ROSA, R. L.; *et al.* Association between Zika virus and future neurological diseases. Journal of the Neurological Sciences, doi:10.1016/j.jns.2019.116617, 2019.

BHAGAT, R.; PRAJAPATI, B.; NARWAL, S.; *et al.* Zika virus E protein alters the properties of human fetal neural stem cells by modulating microRNA circuitry. Cell Death & Differentiation, p. 1-18, jul. 2018.

BOBERMIN, L. D.; QUINCOZES-SANTOS, A.; SANTOS, C. L.; *et al.* Zika virus exposure affects neuron-glia communication in the hippocampal slices of adult rats. Sci Rep 10, 21604. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-78735-y>. 2020.

BONHEUR, A. N.; THOMAS, S.; SOSHNICK, S. H.; *et al.* A fatal case report of antibody-dependent enhancement of dengue virus type 1 following remote Zika virus infection. BMC Infectious Diseases, volume 21, Article number: 749. 2021.

BOORMAN, J. P. T.; PORTERFIELD, J. S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses transmission of Zika virus. Trans R Soc Trop Med Hyg [Internet]. 1956 Mar 50(3):238-42. doi: 10.1016/0035-9203(56)90029-3. 1956.

BRADY, O. J.; HAY, S. I. The first local cases of Zika virus in Europe. The Lancet. DOI:[https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(19\)32790-4](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(19)32790-4). Published:November 18, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Protocolo de Vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika. Plano Nacional de Enfrentamento à Microcefalia no Brasil. Versão 1. 2015.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 08 Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. Brasília, 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico 20. Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas transmitidas pelo *Aedes Aegypti* (dengue, chikungunya e zika), Semanas Epidemiológicas 1 a 26, 2020. Brasília: Ministério da Saúde, 2020.

BUECHLING, T.; BOUTROS, M. Wnt Signaling: Signaling at and Above the Receptor Level. Current Topics in Developmental Biology, v. 97, p. 21–53, jan. 2011.

BURCKSTUMMER, T.; *et al.* An orthogonal proteomic-genomic screen identifies AIM2 as a cytoplasmic DNA sensor for the inflammasome. Nat. Immunol. 10:266-272. 2009.

BYERS, S. L.; WILES, M. V.; DUNN, S. L.; TAFFT, R. A. Mouse estrous cycle identification tool and images. *PLoS ONE*, v. 7, n. 4, p. 1–5, 2012.

CALVET, G.; AGUIAR, R. S.; MELO, A. S.; SAMPAIO, S. A.; FILIPPIS, I.; FABRI, A.; *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis.* 16(6):653-60. 2016.

CAMARGOS, V. N.; FOUREAUX, G.; MEDEIROS, D. C.; *et al.* In-depth characterization of congenital Zika syndrome in immunocompetent mice: Antibody-dependent enhancement and an antiviral peptide therapy. *EBioMedicine.* 44: 516–529. doi: 10.1016/j.ebiom.2019.05.014. 2019.

CAMARGOS, V. N. A Infecção Pré-natal Pelo Zika Virus Em Camundongos Imunocompetentes É Associada Com Anormalidades Da Prole Adulta. 225 f. Tese (Doutorado). Programa de Pós-Graduação em Microbiologia. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte. 2020.

CAMPOS, T. D. L.; DURÃES-CARVALHO, R.; REZENDE, A. M.; *et al.* Revisiting key entry routes of human epidemic arboviruses into the Mainland Americas. *Int J Genomics [Internet]*. 2018 Oct [citado 2019 May 8]; 2018:1-9. 2018.

CAO-LORMEAU, V. M.; ROCHE, C.; TEISSIER, A.; *et al.* Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis*, 20(6):1085-6. doi: 10.3201/eid2006.140138. 2014.

CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *The Lancet.* Volume 387, Issue 10027, 9–15, Pages 1531-1539. 2016.

CARTHEW, R. W.; SONTHEIMER, E. J. Origins and Mechanisms of miRNAs and siRNAs. *Cell.* Volume 136, Issue 4, Pages 642-655. 2009.

CARVALHO, M. C. C. G.; SILVA, D. C. G. Sequenciamento de DNA de nova geração e suas aplicações na genômica de plantas. *Biologia, Cienc. Rural* 40 (3). <https://doi.org/10.1590/S0103-84782010000300040>. 2010.

CARVALHO, Marília Sá. Zika em cadernos de saúde pública: novamente? *Caderno de Saúde Pública* 32 (5). <https://doi.org/10.1590/0102-311XED010516>. 2016.

CARVALHO, M. D. C. G.; *et al.* Sleep EEG patterns in infants with congenital Zika virus syndrome. *Clin. Neurophysiol., Amsterdam*, v. 128, p. 204-214, 2017.

CHIU, C. F.; CHU, L. W.; LIAO, I. C.; SIMANJUNTA, Y.; LIN, Y. L.; JUAN, C. C.; PING, Y. H. The Mechanism of the Zika Virus Crossing the Placental Barrier and the Blood-Brain Barrier. *Frontiers in Microbiology.* Volume 11, article 214. 2020.

CLARKE, P.; LESER, J. S.; BOWEN, R. A.; *et al.* Virus-Induced Transcriptional Changes in the Brain Include the Differential Expression of Genes Associated with Interferon, Apoptosis, Interleukin 17 Receptor A, and Glutamate Signaling as Well as

Flavivirus-Specific Upregulation of tRNA Synthetases. *ASM Journal*. Vol. 5, No2. 2014.

CONESA, A.; MADRIGAL, P.; *et al.* A survey of best practices for RNA-seq data analysis. *Genome Biology*, v. 17, n. 1, p. 13, 2016.

COOPER, T. A.; WAN, L.; *et al.* RNA and disease. *Cell*, v.136, n.4, p. 777-93. 2009.

CORTESE. M.; GOELLNER, S.; ACOSTA, E. G.; *et al.* Ultrastructural Characterization of Zika Virus Replication Factories. *Cell Reports*. 18, 2113–2123. 2017.

CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F.B.; *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534(7606), 267–271. 2016.

COSTA, V. V.; *et al.* Subversion of early innate antiviral responses during antibody-dependent enhancement of Dengue virus infection induces severe disease in immunocompetent mice. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 203, n. 4, p. 231–250, 2014.

COSTA, V.; *et al.* N -Methyl-d-Aspartate (NMDA) Receptor Blockade Prevents Neuronal Death Induced by Zika Virus Infection. *mBio*, v. 8, n. 2, p. e00350-17, 2017.

DANTAS, J. T. P.; CHAGAS, M. L. S.; SILVA, N. V.; ARAGÃO, H. T.; LEAL, C. N. L. Dificuldades da família frente à criança portadora de microcefalia. *Congresso Internacional de Enfermagem. Desafios Contemporâneos para Sustentabilidade e Equidade em Saúde*. V.1 n. 1. 2019.

D'ANTONIO, M.; *et al.* RAP: RNA-Seq Analysis Pipeline, a new cloud-based NGS web application. *BMC Genomics*, v. 16, supl. 6, p. S3. 2015.

DAVID, J.-P.; *et al.* Essential role of RSK2 in c-Fos-dependent osteosarcoma development. *J. Clin. Invest.* 115:664-672. 2005.

DESLAURIERS, J.; *et al.* A two-hit model of suicide-trait-related behaviors in the context of a schizophrenia-like phenotype: Distinct effects of lithium chloride and clozapine. *Physiology and Behavior*. 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene*, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DICK, G. W. Epidemiological notes on some viruses isolated in Uganda (Yellow fever, Rift Valley fever, Bwamba fever, West Nile, Mengo, Semliki forest, Bunyamwera, Ntaya, Uganda S and Zika viruses). *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1953.

- DEJNIRATTISAI, W.; SUPASA, P.; WONGWIWAT, W.; *et al.* Dengue vírus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika virus. *Nat Immunol* 17: 1102–1108. 2016.
- DOBIN, A.; DAVIS, C. A.; SCHLESINGER, F.; *et al.* STAR: ultrafast universal RNA-seq aligner. *Bioinformatics*, v. 29, n. 1, p. 15–21. 2013.
- DOBIN, A.; GINGERAS, T. R. Mapping RNA-seq Reads with STAR. *Current Protocols in Bioinformatic*, v. 51, n. 1, p. 11.14.1-11.14.19, 2015.
- DOOLITTLE, R. Of URFs and ORFs: A primer on how to analyze derived amino acid sequences. University Science Books., Mill Valley, CA. 1996.
- DOU, T. H.; GAO, Y.; CHEN, C. W.; *et al.* Optimized Exon-Exon Junction Library and its Application on Rodents' Brain Transcriptome Analysis. *Biological and Applied Sciences*. Braz. arch. biol. technol. 60. 2017.
- DUFFY, M. R.; CHEN, T-H.; HANCOCK, W. T.; *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New Engl J Med*. 2009.
- EDUVIRGEM, R. V.; FERREIRA, M. E. M. C.; PERICATO, A. J.; SANTOS, D. C. Dengue, Chikungunya e vírus Zika na Região Sul do Brasil. *Essentia Editora Iffluminense, VÉRTICES, Campos dos Goytacazes/RJ*, v.20, n.1, p. 67-80. 2018.
- ESTES, M. L.; MCALLISTER, A. K. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. *Science*, v. 353, n. 6301, p. 772–777, 2016.
- FAIZAN, M. I.; ABDULLAH, M.; ALI, S.; NAQVI, I. H. B.; AHMED, A.; PARVEEN. S. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirolgy* ;59(3):152-158. 2016
- FARIA, N. R.; AZEVEDO, R. D. S. D. S.; KRAEMER, M. U. G.; *et al.* “Zika virus in the Americas: early epidemiological and genetic findings,” *Science*, vol. 352, no. 6283, pp. 345–349, 2016.
- FAYE, O.; FREIRE, C. C. M.; IAMARINO, A.; *et al.* Molecular evolution of Zika Virus during its emergence in the 20 th century. *PLOS Negl Trop Dis*. 2014.
- FERREIRA, R. N.; HOLANDA, G. M.; SILVA, E. V. P.; *et al.* Zika Virus Alters the Expression Profile of microRNA-Related Genes in Liver, Lung, and Kidney Cell Lineages. *Viral Immunology*, Volume 00, Number 00, 1–6, DOI: 10.1089/vim.2017.0186. 2018.
- FIGUEIREDO, C. P.; BARROS-ARAGÃO, F. G. Q.; NERIS, R. L. S.; *et al.* Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. *Nature Communications*. 10:3890/ <https://doi.org/10.3890/s41467-019-11866-7>. 2019.

FINOTELLO, F.; DI CAMILLO, B. Measuring differential gene expression with RNA-seq: challenges and strategies for data analysis. *Briefings in Functional Genomics*, v. 14, n. 2, p. 130–142, mar. 2015.

FNUI. Fundo das Nações Unidas para a Infância. *Redes de Inclusão: garantindo direitos das famílias e das crianças com Síndrome Congênita do Zika vírus e outras deficiências*. Brasília (DF): UNICEF, 2018.

FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J. L. C.; *et al.* Probable non-vectorborne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis*. 2011.

FRANK, C.; CADAR, D.; SCHLAPHOF, A.; *et al.* Sexual transmission of Zika virus in Germany, April 2016. *Euro Surveill* [Internet]. 2016.

FREIRE, C. C. M.; IAMARINO, A.; DE LIMA NETO, D. F.; SALL, A. A.; ZANOTTO, P. M. A. Spread of the pandemic Zika virus lineage is associated with NS1 codon usage adaptation in humans. *BioRxiv*. doi: <http://dx.doi.org/10.1101/032839>. 2015.

FRUMENCE, E.; ROCHE, M.; KREJBICH-TROTOT, P.; *et al.* The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN- β production and apoptosis induction. *Virology*. 493:217-226. 2016.

GALPERIN, M. Y. Conserved 'hypothetical' proteins: new hints and new puzzles. *Comp. Funct. Genomics*, v. 2, p. 14–18. 2001.

GAO, W.; WEN, H.; LIANG, L.; *et al.* IL20RA signaling enhances stemness and promotes the formation of an immunosuppressive microenvironment in breast cancer. *Theranostics*. 11(6): 2564–2580. 2021.

GARCEZ, P. P.; LOIOLA, E. C.; DA COSTA, R. M.; *et al.* Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*. 352:816-18. 2016.

GAUDET, P.; LIVSTONE, M. S.; LEWIS, S. E.; THOMAS, P. D. Phylogenetic-based propagation of functional annotations within the Gene Ontology consortium. *Brief Bioinform* 12:449-462. 2011.

GAWENIS, L. R.; *et al.* Impaired gastric acid secretion in mice with a targeted disruption of the NHE4 Na⁺/H⁺ exchanger. *J. Biol. Chem*. 280:12781-12789, 2005.

GILBERT-JARAMILLO, J.; GARCEZ, P.; JAMES, W.; MOLNÁR, Z.; CLARKE, K. The potential contribution of impaired brain glucose metabolism to congenital Zika syndrome. *Journal of Anatomy* published by John Wiley & Sons Ltd on behalf of Anatomical Society. doi: 10.1111/joa.12959. 2019.

GIMFERRER, I.; *et al.* Regulation of GATA-3 expression during CD4 lineage differentiation. *J Immunol* 186:3892-3898. 2011.

GHOZZI, V. E. L.; BIANCHI, F. T.; MOLINERIS, I.; *et al.* ZIKA vírus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations

involved in severe forms of genetic microcephaly and P53. *Cell Death Dis.* 7(10): e2440. 2016.

GLADWYN-NG, I.; CORDÓN-BARRIS, L.; ALFANO C.; *et al.* Stress-induced unfolded protein response contributes to Zika virus–associated microcephaly. *Nature Neuroscience.* 21, 63–71. 2018.

GOLDSTROHM, A. C.; GREENLEAF A. L.; *et al.* Co-transcriptional *splicing* of pre-messenger RNAs: considerations for the mechanism of alternative *splicing*. *Gene*, v.277, n.1-2, p.31-47. 2001.

GORDON, A.; GRESH, L.; OJEDA, S.; *et al.* Prior dengue vírus infection na drisk of Zika: a pediatric cohortin Nicaragua. *PLoS Med.* 2019.

GRANT, A.; PONIA, S. S.; TRIPATHI, S.; *et al.* Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe.* 19, 882-890. 2016.

GUZMAN, M. G.; ALVAREZ, M.; HALSTEAD, S. B. Secondary infection as a risk factor for dengue hemorrhagic fever/dengue shock syndrome: an historical perspective and role of antibody-dependent enhancement of infection. *Archives of Virology*, v. 158, n. 7, p. 1445-1459. 2013.

GUZMAN, M. G.; HARRIS, E. Dengue. *The Lancet*, v. 385, n. 9966, p. 453–465. 2015.

HALAI, U. A.; *et al.* Maternal Zika virus disease severity, virus load, prior dengue antibodies, and their relationship to birth outcomes. *Clinical Infectious Diseases*, v. 65, n. 6, p. 877–883. 2017.

HAMAD, Graziela Brito Neves Zboralski. Vivências de mulheres - mães de crianças com síndrome congênita do Zika vírus. Tese (Doutorado). 226f. Programa de Pós-Graduação em Enfermagem, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, 2019.

HAMEL, R.; DEJARNAC, O.; WICHIT, S.; *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

HARSH, S.; FU, Y.; KENNEY, E.; *et al.* Zika virus non-structural protein NS4A restricts eye growth in *Drosophila* through regulation of JAK/STAT signaling. *Disease Models e Mechanisms.* Volume 13, Issue 4. 2020.

HASLWANTER, D.; BLAAS, D.; HEINZ, F. X.; STIASNY, K. A novel mechanism of antibody-mediated enhancement of flavivirus infection. *PLoS Pathog.* 13(9):e1006643. 2017.

HASSERT, M.; BRIEN, J. D.; PINTO, A. K. Mouse Models of Heterologous Flavivirus Immunity A Role for Cross-Reactive T Cells. *Frontiers in Immunology.* Volume 10, article 1045. 2019.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flavivirus membrane fusion. *J Gen Virol*, vol. 87, 2755-2766. 2006.

HEINZ, F. X.; STIASNY, K. Flaviviruses and their antigenic structure. *J. Clin. Virol.* 55, 289–295. 2012.

HOFMANN, K.; RODRIGUEZ-RODRIGUEZ, R.; GAEBLER, A.; *et al.* Astrocytes and oligodendrocytes in grey and white matter regions of the brain metabolize fatty acids. *Sci Rep* 7(1), 10779. 2017.

HU, Y.; SUN, L. Systematic Analysis of Structure Similarity between Zika Virus and Other Flaviviruses. *ACS Infect. Dis.* 5, 1070–1080. 2019.

HUANG, Y.; *et al.* Zika virus propagation and release in human fetal astrocytes can be suppressed by neutral sphingomyelinase-2 inhibitor GW4869. *Cell Discov*, 4, 19. 2018.

IBGE. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tabela 2679 - Nascidos vivos, por ano de nascimento, idade da mãe na ocasião do parto, sexo e lugar do registro. IBGE, 2019.

ISLAM, S.; KHAN, A.; MURAD, W.; *et al.* In silico analysis revealed Zika virus miRNAs associated with viral pathogenesis through alteration of host genes involved in immune response and neurological functions. *Journal of Medical Virology*. Volume91, Issue9. Pages 1584-1594. 2019.

KAID, C.; GOULART, E.; CAIRES-JÚNIOR, L. C.; *et al.* Zika Virus Selectively Kills Aggressive Human Embryonal CNS Tumor Cells In Vitro and In Vivo. *Cancer Research*, v. 78, n. 12, p. 3363–3374, jun. 2018.

KAM, Y.-W. *et al.* Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus–Infected Patients in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases*, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017.

KARIMI, O.; *et al.* Thrombocytopenia and subcutaneous bleedings in a patient with Zika. *The Lancet*, v. 387, n. 10022, p. 939–940. 2016.

KARIMI, E.; AZARI, H.; YARI, M.; *et al.* Interplay between SARS-CoV-2-derived miRNAs, immune system, vitamin D pathway and respiratory system. *Journal of Cellular and Molecular Medicine*. Volume25, Issue16, Pages 7825-7839. 2021.

KATZELNICK, L. C.; *et al.* Antibody-dependent enhancement of severe dengue disease in humans. *Science*, v. 358, n. 6365, p. 929–932. 2017.

KIM, G. S.; STEPHENSON, J.; WU, T.; *et al.* Abstract P727: Single-Cell RNA Sequencing Identifies Ifi2712a as a Novel Gene Involved in Regulating Microglial Inflammation in the Context of Aging and Stroke. *Stroke*. 52:AP727. https://doi.org/10.1161/str.52.suppl_1.P727. 2021.

KOLI, S.; LABELLE-DUMAIS, C.; ZHAO, Y.; *et al.* Identification of MFRP and the secreted serine proteases PRSS56 and ADAMTS19 as part of a molecular network involved in ocular growth regulation. *Plos Genetics*. <https://doi.org/10.1371/journal.pgen.1009458>. 2021.

KWONG, J. C.; DRUCE, J. D.; LEDER, K. Zika virus infection acquired during brief travel to Indonesia. *Am J Trop Med Hyg.* 89:516–7. 2013.

LABRADA, L.; *et al.* Age-dependent resistance to lethal alphavirus encephalitis in mice: analysis of gene expression in the central nervous system and identification of a novel interferon-inducible protective gene, mouse ISG12. *J. Virol.* 76:11688-11703. 2002.

LANCIOTTI, R. S.; KOSOY, O. L.; LAVEN, J. J.; *et al.* Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis.* 14(8):1232-9. 2008.

LAW, C. W.; ALHAMDOOSH, M.; SU, S.; SMYTH, G. K.; RITCHIE, M. E. RNA-seq analysis is easy as 1-2-3 with limma, Glimma and edgeR. *F1000Research*, v. 5, p. 1408, 2016.

LEBLANC, S.; BRUNET, M. A. Modelling of pathogen-host systems using deeper ORF annotations and transcriptomics to inform proteomics analyses. *Computational and Structural Biotechnology Journal*. Volume 18, Pages 2836-2850. 2020.

LI, H.; *et al.* Zika virus infects neural progenitors in the adult mouse brain and alters proliferation. *Cell Stem Cell* 19, 593–598. 2016a.

LI, C.; XU, D.; YE, Q.; HONG, S.; JIANG, Y.; LIU, X.; *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19: 672. 2016b.

LI, J.; QIN, X.; SHI, J.; *et al.* A systematic CRISPR screen reveals an IL-20/IL20RA-mediated immune crosstalk to prevent the ovarian cancer metastasis. *Cancer Biology*. 10:e66222 DOI: 10.7554/eLife.66222. 2021.

LIANG, Q.; LUO, Z.; ZENG, J.; CHEN, W.; FOO, S. S.; LEE, S. S.; *et al.* Zika virus NS4A and NS4B proteins deregulate Akt-mTOR signaling in human fetal neural stem cells to inhibit neurogenesis and induce autophagy. *Cell Stem Cell.* 19(5):663-71. 2016.

LIN, B.; WANG, J.; CHENG, Y. Recent Patents and Advances in the Next-Generation Sequencing Technologies. *Recent Patents on Biomedical Engineering*, v. 2008, n. 1, p. 60– 67, 2008.

LIU, L.; *et al.* Comparison of Next-Generation Sequencing Systems. *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, p. 11. 2012.

LIU, Z. Y.; SHI, W. F.; QIN, C. F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. *Progress. Nature Reviews – Microbiology*. Volume 17, 131. 2019a.

LIU, T.; TANG, L.; TANG, H.; *et al.* Zika Virus Infection Induces Acute Kidney Injury Through Activating NLRP3 Inflammasome Via Suppressing Bcl-2. *Front. Immunol.* <https://doi.org/10.3389/fimmu.2019.01925>. 2019b.

LOPES, R. Viral-associated thrombotic microangiopathies. *Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy*, v. 4, n. 2, p. 51–59. 2011.

LUCAS, T. M.; RICHNER, J. M.; DIAMOND, M. S. The Interferon-Stimulated Gene Irf2712a Restricts West Nile Virus Infection and Pathogenesis in a Cell-Type- and Region-Specific Manner. *J Virol*. 90 (5): 2600–15. 10.1128 / JVI.02463-15. 2015.

LUM, F. M.; *et al.* Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clin Infect Dis*, 64, 914-920. 2017.

MADRID, M. C. F. S. Identificação de Interação Proteína-Proteína entre NS5 do vírus da Febre Amarela e Proteínas Celulares. Dissertação Mestrado (Ciências da Saúde). Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto-SP. 2007

MAGORO, T.; *et al.* IL-1beta/TNF-alpha/IL-6 inflammatory cytokines promote STAT1-dependent induction of CH25H in Zika virus-infected human macrophages. *J Biol Chem*, 294, 14591-14602. 2019.

MAHARAJAN, M. K.; RANJAN, A.; CHU, J. F.; *et al.* Zika Virus Infection: Current Concerns and Perspectives. *Clinic Rev Allerg Immunol*. DOI 10.1007/s12016-016-8554-7. 2016.

MAIRIANG, D.; ZHANG, H.; SODJA, A.; *et al.* Identification of New Protein Interactions between Dengue Fever Virus and Its Hosts, Human and Mosquito. *PLoS ONE* 8(1): e53535. 2013.

MALLET, H. -P.; VIAL, A. -L.; MUSSO, D. Bilan De L'Epidemie a Virus Zika En Polynesie Francaise, 2013-2014. *Bulletin d'information sanitaires, epidemiologiques et statistiques*, v. 13, p. 1–8, 2015.

MANOKARAN, G.; FINOL, E.; WANG, C.; *et al.* Dengue subgenomic RNA binds TRIM25 to inhibit interferon expression for epidemiological fitness. *Science*. 9;350(6257):217-21. 2015.

MARDIS, E. R. Next-generation Sequencing platforms. *Annual Review of Analytical Chemistry* 6(1):287–303. 2013.

MARGULIES, M.; EGHOLM, M.; ALTMAN, W. E.; *et al.* Genome sequencing in microfabricated high-density picolitre reactors. *Nature* 437: 376-380. 2005.

MARTINS, M. C. C.; OLIVEIRA, A. S. S. S. Zinco, vitamina D e sistema imune: papel na infecção pelo novo coronavírus. *Revista da FAESF*, vol. 4. Número especial COVID 19. Junho (2020) 16-27. 2020.

MATSUDA, K.; BUDISANTOSO, T.; MITAKIDIS, N.; *et al.* Transsynaptic Modulation of Kainate Receptor Functions by C1q-like Proteins. *Neuron*. Volume 90, Issue 4, 18, Pages 752-767. 2016.

MEERTENS, L.; *et al.* Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep*, 18, 324-333. 2017.

MELO, A. S. O.; AGUIAR, R. S.; AMORIM, M. M. R.; *et al.* Congenital Zika Virus Infection Beyond Neonatal Microcephal. *JAMA Neurology*. 1;73(12):1407-1416. doi: 10.1001/jamaneurol.2016.3720. 2016.

MELO, A.; GAMA, G. L.; SILVA JÚNIOR, R. A.; ASSUNÇÃO, P. L.; *et al.* Motor function in children with congenital Zika syndrome. *Developmental Medicine e Child Neurology*. DOI: 10.1111/dmcn.14227. 2019.

METZKER, M. L. Sequencing technologies — the next generation. *Nature Reviews Genetics*, v. 11, n. 1, p. 31–46, jan. 2010.

MEYER, U.; ENGLER, A.; WEBER, L.; *et al.* Preliminary evidence for a modulation of fetal dopaminergic development by maternal immune activation during pregnancy. *Neuroscience*, v. 154, n.2, p.701-709. 2008.

MINER, J. J.; CAO, B.; GOVERO, J.; *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016.

MINER, J. J.; DIAMOND, M. S. Zika vírus pathogenesis and tissue tropism. *Cell Host e Microbe*, 21. 2017.

MITCHELL, A.; C. RENTERO.; Y. ENDOH.; *et al.* "LILRA5 Is Expressed by Synovial Tissue Macrophages in Rheumatoid Arthritis, Selectively Induces Pro-inflammatory Cytokines and IL-10 and Is Regulated by TNF-alpha, IL-10 and IFN-gamma". *European Journal of Immunology* 38 (12): 3459 - 3473. doi:10.1002 / eji.200838415. 2008.

MLAKAR, J.; KORVA, M.; TUL, N.; POPOVIC, M.; *et al.* Zika virus associated with microcephaly. *New England Journal of Medicine*, v. 374, n. 10, p. 951-958, 2016.

MORETO, J.; IZQUIERDO, A.; EMES, R. D. Assembly, Assessment, and Availability of De Novo generated eukaryotic Transcriptomes. *Frontiers in genetics*. 6: 361. 2015.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Zika virus: following the path of dengue and chikungunya? *Lancet* [Internet]. 2015.

MUSSO, D.; RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; LEVI, J. E.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. Unexpected outbreaks of arbovirus infections: lessons learned from the Pacific and tropical America. *Lancet Infect Dis*. 18(11):e355-e361. 2018.

MUTSUGA, N.; *et al.* Homeobox protein Gsh-1-dependent regulation of the rat GHRH gene promoter. *Mol. Endocrinol.* 15:2149-2156, 2001.

MUTZ, K.-O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖ, M.; WALTER, J.-G.; STAHL, F.; MÜ, S.; HILLER, K. Transcriptome analysis using next-generation sequencing This review comes from a themed issue on Analytical biotechnology. *Current Opinion in Biotechnology*, v. 24, p. 22–30, 2013.

NACCACHE, S. N.; THÉZÉ, J.; SARDI, S. I.; *et al.* Distinct zika virus lineage in Salvador, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 22(10):1788-92. 2016.

NAGARAJAN, E.; RUBIN, M.; WIJDICKS, E. F. M.; *et al.* Guillain-Barré syndrome after surgical procedures: predisposing factors and outcome. *Neurol Clin Pract in revision.* 2016.

NAVECA, F. G.; PONTES, G. S.; CHANG, A. Y.; *et al.* Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem. Inst. Oswaldo Cruz* vol.113 no.6 Rio de Janeiro. 2018.

NILSEN T. W, GRAVELEY B. R. Expansion of the eukaryotic proteome by alternative splicing. *Nature*; 463: 457–463. 2010.

NOWAKOWSKI, T. J.; POLLEN, A. A.; DI LULLO, E.; SANDOVAL-ESPINOSA, C.; BERSHTEYN, M.; KRIEGSTEIN, A. R. Expression analysis highlights AXL as a candidate Zika virus entry receptor in neural stem cells. *Cell Stem Cell* 18:591-596. 2016.

OJHA, C. R.; *et al.* Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus. *Frontiers in Immunology.* 2018.

OJHA, C. R.; RODRIGUEZ, M.; KARUPPAN, M. K. M.; *et al.* O receptor Toll-like 3 regula a infecção pelo vírus Zika e a resposta inflamatória do hospedeiro associada em astrócitos humanos primários. *PLoS One* 14: e0208543. 2019.

OLSON, C. K.; IWAMOTO, M.; PERKINS, K. M.; *et al.* Preventing Transmission of Zika Virus in Labor and Delivery Settings Through Implementation of Standard Precautions - United States. *Informe Semanal de Morbilidad y Mortalidad (MMWR)* 2016;65:290–292. DOI: <http://dx.doi.org/10.16/mmwr.mm6511e3>. 2016.

ONYANGO, M. G.; BIALOSUKNIA, S. M.; PAYNE, A. F.; *et al.* Increased temperatures reduce the vectorial capacity of Aedes mosquitoes for Zika vírus. *Emerging Microbes e Infections.* VOL. 9. <https://doi.org/10.1080/22221751.2019.1707125>. 2020.

OPAL, S. M. Interactions between Coagulation and Inflammation. *Scandinavian Journal of Infectious Diseases*, v. 35, p. 545–554. 2003.

OZSOLAK, F.; MILOS, P. M. RNA sequencing: advances, challenges and opportunities. *Nature Reviews. Genetics*, v. 12, n. 2, p. 87–98, fev. 2011.

PAGE, M.; THORPE, R. Purification of monoclonal antibodies. In: *Immunochemical Protocols*. [s.l.] Springer, p. 113–119. 1998.

PARK, S. Y.; LEE, J.; HA, M.; *et al.* miR-29 miRNAs activate p53 by targeting p85 α and CDC42. *Nat Struct Mol Biol* 16, 23–29. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1533>. 2009.

PETTERSSON, J. H.; BOHLIN, J.; DUPONT-ROUZEYROL, M.; *et al.* Re-visitar a evolução, dispersão e epidemiologia do vírus Zika na Ásia. *Emerg. Micróbios infectam.* 7, 79, 2018.

PETZOLD, S.; AGBARIA, N.; DECKERT, A.; *et al.* Congenital abnormalities associated with Zika virus infection–Dengue as potential co-factor? A systematic review. *Plos Neglected Tropical Diseases*. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0008984>. 2021.

PORTELA, T. F.; ALMEIDA, L. M. B.; BELCHIOR, L. D. Percepção de Genitoras sobre a Intervenção Neuropsicomotora em Crianças com Microcefalia. *Neurocienc* 28:1-22. 2020.

POSSAS, Cristina. Zika: what we do and do not know based on the experiences of Brazil. *Epidemiology and health*, v. 38, 2016.

POSSAS, Cristina; *et al.* Zika puzzle in Brazil: peculiar conditions of viral introduction and dissemination-A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz*, v. 112, n. 5, p. 319-327, 2017.

PROENÇA-MODENA, J. L.; MILANEZ, G. P.; COSTA, M. L.; JUDICE, C. C.; MARANHÃO COSTA, F. T. Zika virus: lessons learned in Brazil. *Microbes and Infection*. 2018.

PURCELLI, D. F.; MARTIN, M. A. Alternative splicing of human immunodeficiency virus type 1 mRNA modulates viral protein expression, replication, and infectivity. *J Virol.*;67:6365–6378. 1993.

QUICKE, K. M.; *et al.* Zika virus infects human placental macrophages. *Cell Host Microbe* 20, 1–8. 2016.

RADFORD, A. D.; CHAPMAN, D.; DIXON, L.; CHANTREY, J.; DARBY, A. C.; HALL, N. Application of next-generation sequencing technologies in virology. *The Journal of General Virology*, v. 93, pt 9, p. 1853–1868, set. 2012.

RATHORE, A. P. S.; *et al.* Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus–induced microcephaly in fetuses. *Science Advances*. 2019.

REGAN, R. L.; BRUECKNER, A. L. Comparison by electron microscopy of the Ntaya and Zika viruses. *Tex Rep Biol Med*. 11(2):347-51. 1953.

- RODRIGUEZ-BARRAQUER, I.; COSTA, F.; NASCIMENTO, E.; *et al.* Impact of preexisting dengue immunity on Zika virus emergence in a dengue endemic region. *Science*.363(6427):607–610. 2019.
- ROGIC, S.; MACKWORTH, A. K.; OUELLETTE, F. B. F. Evaluation of gene-finding programs on mammalian sequences., *Genome Research*, 11, 817-832. 2001.
- ROMBI, F.; BAYLISS, R.; TUPLIN, A.; YEOH, S. The journey of Zika to the developing brain. *Molecular Biology Reports* (<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05349-y>). 2020.
- ROPIDI, M. I. M.; KHAZALI, A. S.; RASHID, N. N.; YUSOF, R. Endoplasmic reticulum: a focal point of Zika virus infection. *Journal of Biomedical Science*, 27:27. 2020.
- ROYCE, T. E.; ROZOWSKY, J. S.; GERSTEIN, M. B. Toward a universal microarray: prediction of gene expression through nearest-neighbor probe sequence identification. *Nucleic Acids Research*, v. 35, n. 15, 2007.
- SAMPAIO, G. S.; BRITES, C.; DREXLER, J. F.; MOREIRA-SOTO, A.; MIRANDA, F.; NETTO, E. M. Expansão da circulação do vírus Zika da África à América, 1947-2018: revisão da literatura. *Epidemiol. Serv. Saude, Brasília*, 28(2):e2018411, 2019.
- SANGALETTI, R.; D'AMICO, M.; GRANT, J.; *et al.* Knock-out de uma sirtuin mitocondrial protege os neurônios da degeneração em *Caenorhabditis elegans*. *PLoS Genet* 13: e1006965. 2017.
- SANGER, F.; AIR, G. M.; BARRELL, B. G.; *et al.* Nucleotide sequence of bacteriophage ϕ X174 DNA. *Nature* 265(5596):687–695. 1977.
- SANPHUI, P.; DAS, A. K.; BISWAS, S. C. FoxO3a requer BAF57, uma subunidade do complexo remodelador de cromatina SWI / SNF para indução de PUMA em um modelo de doença de Parkinson. *J Neurochem* doi: 10.1111 / jnc.14969. 2020.
- SANTANA, M. B.; LAMAS, C. C.; ATHAYDE, J. G.; CALVET, G.; MOREIRA, J.; LORENZO, A. Congenital Zika Syndrome: Is the Heart Part of Its Spectrum? *Clin Microbiol Infect*, 25(8):1043-1044. doi: 10.1016/j.cmi.2019.03.020. 2019.
- SARIOL, C. A.; NOGUEIRA, M. L.; VASILAKIS, N. A tale of two viruses: does heterologous flavivirus immunity enhance Zika disease? *Trends Microbiol*. 2018.
- SARMIENTO-OSPINA, A.; *et al.* Zika virus associated deaths in Colombia. *The Lancet*, v. 16, n. 5, p. 523–524, 2016.
- SÉRIÉ, C.; CASALS, J.; PANTHIER, R.; BRÈS, P.; WILLIAMS, M. C. Studies on yellow fever in Ethiopia. 2. Serological study of the human population. *Bull World Health Organ* [Internet]. 1968.

SHAO, Z.; *et al.* DNA-PKcs has KU-dependent function in rRNA processing and haematopoiesis. *Nature*, v. 579, n. 7798, p. 291–296. 2020.

SHARMA, A.; LOU, H. Depolarization-mediated regulation of alternative splicing. *Frontiers in Neuroscience*. 5. 2011.

SHARP, T. M.; *et al.* Severe Thrombocytopenia after Zika Virus Infection, Guadeloupe, 2016. *Clinical Infectious Diseases*, p. 1–11. 2016.

SHERIDAN, M. A.; YUNUSOV, D.; BALARAMAN, V.; *et al.* Vulnerability of primitive human placental trophoblast to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E1587–E1596. 2017.

SHIRJANG, S.; MANSOORI, B.; ASGHARI, S.; *et al.* MicroRNAs in cancer cell death pathways: apoptosis and necroptosis. *Free Radic Biol Med*. 139:1-15. 2019.

SHOKRALLA, S.; *et al.* Next-generation DNA barcoding: Using next-generation sequencing to enhance and accelerate DNA barcode capture from single specimens. *Molecular Ecology Resources* 14(5): 892–901. 2014.

SHUAI, K.; HORVATH, C. M.; HUANG, L. H. T.; *et al.* Interferon activation of the transcription factor Stat91 involves dimerization through SH2-phosphotyrosyl peptide interactions. *Cell* 76, 821-828. 1994.

SIFUENTES-DOMINGUEZ, L.; LI, H.; LLANO, E.; *et al.* SCGN deficiency results in colitis susceptibility. *Genetics and Genomics Immunology and Inflammation*. DOI: 10.7554/eLife.49910. 2019.

SIGIN, V. O.; KALINKIN, A. I.; KUZNETSOVA, E. B.; *et al.* DNA methylation markers panel can improve prediction of response to neoadjuvant chemotherapy in luminal B breast cancer. *Scientific Reports*. 10, Article number: 9239. 2020.

SIROHI, D. *et al.* The 3.8 Å resolution cryo-EM structure of Zika virus. *Science (New York, N.Y.)*, v. 352, n. 6284, p. 467–70, 2016.

SIVASHANKARI, S.; SHANMUGHAVEL, P. Functional annotation of hypothetical proteins – A review. *Bioinformatics*. 2006.

SMITH, S. E. P.; LI, J.; *et al.* Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. *Neurobiology of Disease*. *The Journal of Neuroscience*, 27(40):10695–10702. 2007.

SOARES DE SOUZA, A.; MORAES DIAS, C.; BRAGA, F. D. C. B.; *et al.* Fetal Infection by Zika Virus in the Third Trimester: Report of 2 Cases. *Clinical Infectious Diseases* 63: 1622–1625. 2016.

SONG, Byung-Hak; *et al.* Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. *J. Neuroimmunol.*, v. 308, p. 50-64, July 2017.

STEPP, M. W.; *et al.* The c10orf10 gene product is a new link between oxidative stress and autophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1843:1076-1088. 2014.

STROHER, P. R. Sequenciamento de nova geração e entomologia: Novas perspectivas para antigos questionamentos. *Revista da Biologia*, 18(1): 6-16. DOI: 10.7594/revbio.18.01.02. 2018.

STROTTMANN, D. M.; ZANLUCA, C.; MOSIMANN, A. L. P.; *et al.* Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. *Mem Inst Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro*, Vol. 114: e190150, 2019.

STROYNOWSKA-CZERWINSKA, A.; FISZER, A.; KRZYZOSIAK, W. J. The panorama of miRNA-mediated mechanisms in mammalian cells. *Cell Mol Life Sci.* 71(12):2253-2270. 2014.

SUBRAMANIAN, A.; *et al.* Gene set enrichment analysis: A knowledge-based approach for interpreting genome-wide transcription profiles. *PNAS*, v. 102, n. 43, p. 15545-15550. 2005.

TAN, X.; ZHOU, Q.; LV, M.; *et al.* Functional Genetic Polymorphisms in the IL1RL1–IL18R1 Region Confer Risk for Ocular Behçet's Disease in a Chinese Han Population. *Frontiers in Genetics*. <https://doi.org/10.3389/fgene.2020.00645>. 2020.

TANG, H.; HAMMACK, C.; OGDEN, S. C.; *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors and Attenuates Their Growth. *Cell stem cell* 18: 587–590. 2016.

TAPPE, D.; PÉREZ-GORÓN, J. V.; ZAMMARCHI, L.; *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. *Medical Microbiology and Immunology*, v. 205, n. 3, p. 269– 273, 2016.

THOMAS, D. L.; *et al.* Local Transmission of Zika Virus--Puerto Rico, November 23, 2015-January 28, 2016. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 65, n. 6, p. 154–8, 19 fev. 2016.

TRUONG, A. D.; HONG, Y.; NGUYEN, C.T.; *et al.* Molecular identification and characterisation of a novel chicken leukocyte immunoglobulin-like receptor A5. *Molecular, Cellular and Developmental Biology*. Pages 68-80. <https://doi.org/10.1080/00071668.2020.1812524>. 2020.

VALLE, D.; PIMENTA, D. N.; AGUIAR, R. Zika, dengue and chikungunya: challenges and issues. *Epidemiol. Serv. Saúde* 25 (2) Apr-Jun. <https://doi.org/10.5123/S1679-49742016000200020>. 2016.

VARGAS, A., *et al.* Características dos primeiros casos de microcefalia possivelmente relacionados ao vírus Zika notificados na Região Metropolitana de Recife, Pernambuco. *Epidemiologia e Serviços de Saúde*, 25, n. 4, 2016.

VENTER, J. C.; ADAMS, M. D.; *et al.* The sequence of the human genome. *Science*, v. 291, n. 5507, p.1304-51. 2001.

VENTURA, C. V.; *et al.* Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet*, v. 387, n. 10015, p. 228. 2016.

VERMA, D.; BAIS, S.; GAILLARD, M.; SWAMINATHAN, S. Epstein-Barr Virus SM Protein Utilizes Cellular Splicing Factor SRp20 To Mediate Alternative Splicing. *Journal of Virology*; 84: 22, - 11781–11789. 2010.

WAGNER, L.; OLIYARNYK, O.; GARTNER, W.; *et al.* Cloning and expression of secretagoin, a novel neuroendocrine- and pancreatic islet of Langerhans-specific Ca²⁺-binding protein. *Journal of Biological Chemistry*. 275(32):24740–24751. 2000.

WALTER, W.; SÁNCHEZ-CABO, F.; RICOTE, M. GOplot: an R package for visually combining expression data with functional analysis: Fig. 1. *Bioinformatics*, v. 31, n. 17, p. 2912–2914, set. 2015.

WANG, Z.; GERSTEIN, M.; SNYDER, M. RNA-Seq: a revolutionary tool for transcriptomics. *Nature Reviews Genetics*, v. 10, n. 1, p. 57–63, jan. 2009.

WANG, T.; LIU, J.; SHEN, L.; *et al.* STAR: an integrated solution to management and visualization of sequencing data. *Bioinformatics*, v. 29, n. 24, p. 3204–3210, dez. 2013.

WANG, W. H.; *et al.* An epidemiological survey of the current status of Zika and the immune interaction between dengue and Zika infection in Southern Taiwan. *International Journal of Infectious Diseases*, v. 93, p. 151–159. 2020a.

WANG, Y.; REN, K.; LI, S.; *et al.* Interferon stimulated gene 15 promotes Zika virus replication through regulating Jak/STAT and ISGylation pathways. *Virus Research*. Volume 287, 198087. 2020b.

WEIDNER, C.; STEINFATH, M.; WISTORF, E.; *et al.* A Protocol for Using Gene Set Enrichment Analysis to Identify the Appropriate Animal Model for Translational Research. *Journal of Visualized Experiment* : JoV , n. 126, ago. 2017.

WHO – World Health Organizations. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (IHR 2005) Emergency Committee on Zikavirus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. 2016a. Disponível em: < <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>>. Acesso em 08 de maio de 2020.

WHO - World Health Organizations. Zika virus infection: global update on epidemiology and potentially associated clinical manifestations. *Wkly Epidemiol Rec*, 91(7): p. 73–81. 2016b.

WHO - World Health Organization. Assessment of infants with microcephaly in the context of Zika virus. 2016c.

WHO – World Health Organization. Zika Epidemiology Update. 2019. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/zika/zika-epidemiology-update-july-2019.pdf>>. Acesso em 08 de maio de 2020.

WICHIT, S.; HAMEL, R.; YAINOY, S.; *et al.* Interferon-inducible protein (IFI) 16 regulates Chikungunya and Zika virus infection in human skin fibroblasts. *EXCLI J.* 18: 467–476. 2019.

WICKHAM, H. *GGPlot Elegant Graphics for Data Analysis*. New York: Springer, 2016.

WIJDICKS, E. F. M.; KLEIN, C. J. Guillain-Barré Syndrome. *Symposium on Neurosciences. Mayo Clin Proc. VOLUME 92, EDIÇÃO 3, P467-479*, <http://dx.doi.org/10.1016/j.mayocp.2016.12.002>. 2017.

WILEY, C. A.; CHIMELLI, L. Human Zika and West Nile virus neurological infections: What is the difference? *Neuropathology*, neup.12385. 2017.

WONG, P-S. J.; LI, M. I.; CHONG, C-S. N. G. L-C.; TAN, C-H. *Aedes (Stegomyia) albopictus (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore*. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7: e2348. 2013.

XU, J.; DOU, T.; LIU, C.; *et al.* The evolution of alternative splicing exons in vascular endothelial growth factor A. *Gene*. 2011.

YEO, G.; HOLSTE, D.; KREIMAN, G.; BURGE, C. B. Variation in alternative splicing across human tissues. *Genome biology*. 5(10):R74. 2004.

ZANLUCA, C.; MELO, V. C.; MOSIMANN, A. L.; SANTOS, G. I.; SANTOS, C. N.; LUZ, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz [Internet]*. 2015.

ZHENG, Z-M. Regulation of alternative RNA splicing by exon definition and exon sequences in viral and mammalian gene expression. *J Biomed Sci*; 11(3):278–294. 2004.

ZIMMERMAN, M. G.; *et al.* Cross-Reactive Dengue Virus Antibodies Augment Zika Virus Infection of Human Placental Macrophages. *Cell Host and Microbe*, v. 24, n. 5, p. 731- 742.e6. 2018.

ANEXOS

Anexo A – Análises de Genes Diferencialmente Expressos em V1XV3 (Expressão Diferencial, Enriquecimento de Via e Enriquecimento do Conjunto Genético)

Tabela 4: Genes diferencialmente expressos em V1XV3.

Gene	External Gene Name	log2FoldChange	pvalue
Gm21738	ENSMUSG00000095280	2,146112264	0,0009645
Gm26870	ENSMUSG00000097312	2,065016111	0,000385
Ifi2712a	ENSMUSG00000079017	1,992263948	0,0010625
Ifi209	ENSMUSG00000043263	1,938962073	0,0000572
Gm10800	ENSMUSG00000075014	1,866824173	0,0010465
Zbp1	ENSMUSG00000027514	1,853834436	0,0023495
Gm4951	ENSMUSG00000073555	1,810946943	0,0002438
Spo11	ENSMUSG00000005883	1,638776574	0,0071023
H2-Q6	ENSMUSG00000073409	1,518039633	0,0036703
Six1	ENSMUSG00000051367	1,480514079	0,0060486
Gm37755	ENSMUSG00000103382	1,364234613	0,0079837
Gm12447	ENSMUSG00000080816	1,299452486	0,0009682
F5	ENSMUSG00000026579	1,288546353	0,0426506
Gm11537	ENSMUSG00000085242	1,278276983	0,0040672
H2-Q7	ENSMUSG00000060550	1,255136769	0,000226
Ifi204	ENSMUSG00000073489	1,235139511	0,0232698
Srpx	ENSMUSG00000090084	1,233029511	0,0079377
Nlrp1c-os	ENSMUSG00000092528	1,225526975	0,0191789
Gm37132	ENSMUSG00000103443	1,208466738	0,0092383
Tgtp1	ENSMUSG00000078922	1,190751054	0,0004236
Gm39456	ENSMUSG00000110760	1,174346737	0,019255
Lgals3bp	ENSMUSG00000033880	1,152711478	0,0033373
Mboat4	ENSMUSG00000071113	1,138129054	0,0482137
Usp18	ENSMUSG00000030107	1,098275864	0,0020951
Gm9916	ENSMUSG00000104178	1,067097832	0,0207311
G730003C15Rik	ENSMUSG00000097573	1,063538593	0,0025367
Oas1b	ENSMUSG00000029605	1,043805661	0,0359282
Has2	ENSMUSG00000022367	1,026973858	0,0051607
Ccl12	ENSMUSG00000035352	1,016205448	0,0311491
Tmem154	ENSMUSG00000056498	-1,010020401	0,0367653
Depp1	ENSMUSG00000048489	-1,023506153	0,0055216
Sfn3	ENSMUSG00000018986	-1,039407041	0,0015873
Kcnq1	ENSMUSG00000009545	-1,057153779	0,0044099
Zfp473	ENSMUSG00000048012	-1,092007226	0,0100561
Gm39323	ENSMUSG00000111229	-1,133315889	0,0212394
Pcdh12	ENSMUSG00000024440	-1,133421036	0,0190429
Hmcn1	ENSMUSG00000066842	-1,149517566	1,973E-09
Rln1	ENSMUSG00000039097	-1,151878668	0,0120504
Gm15169	ENSMUSG00000086188	-1,182946573	0,0224043
Gm44229	ENSMUSG00000108088	-1,230151733	0,0015574
Magix	ENSMUSG00000031147	-1,231865988	0,0016908
Gm9946	ENSMUSG00000054488	-1,505167269	0,0001822
Gm37629	ENSMUSG00000102316	-1,533734802	0,0008013

A tabela mostra em ordem decrescente do valor de \log_2 FoldChange os genes diferencialmente expressos na comparação entre V1XV3, bem como os valores de pvalue.

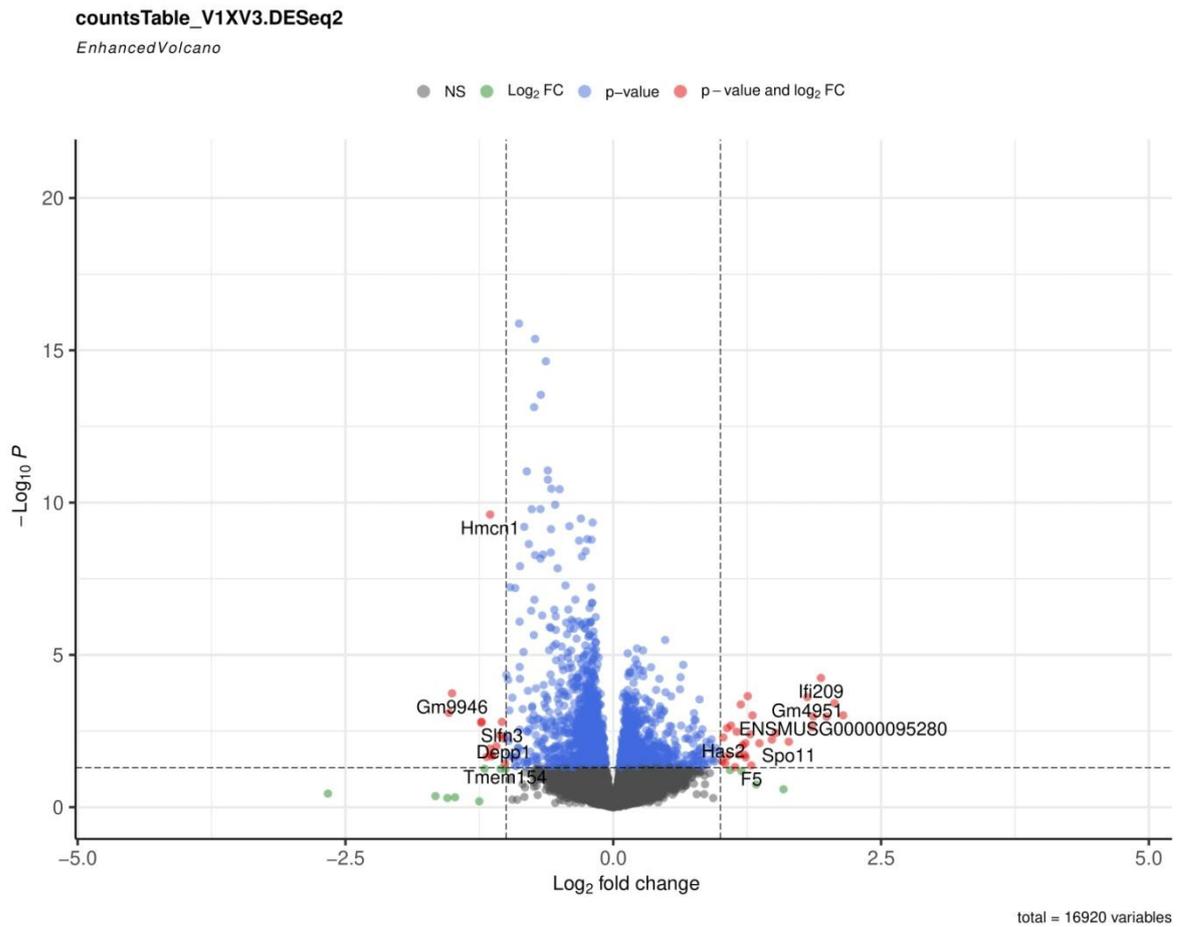


Figura 25: Volcano plot V1XV3. O gráfico mostra os genes diferencialmente expressos em V1XV3 de acordo com as métricas: $p \leq 0,05$ e $\log_2 FC \leq -1$ ou ≥ 1 . Foram observados 43 genes diferencialmente expressos nessas condições, sendo 29 ativados e 14 suprimidos. São observados mais genes sendo ativados quando comparado aos genes negativamente expressos.

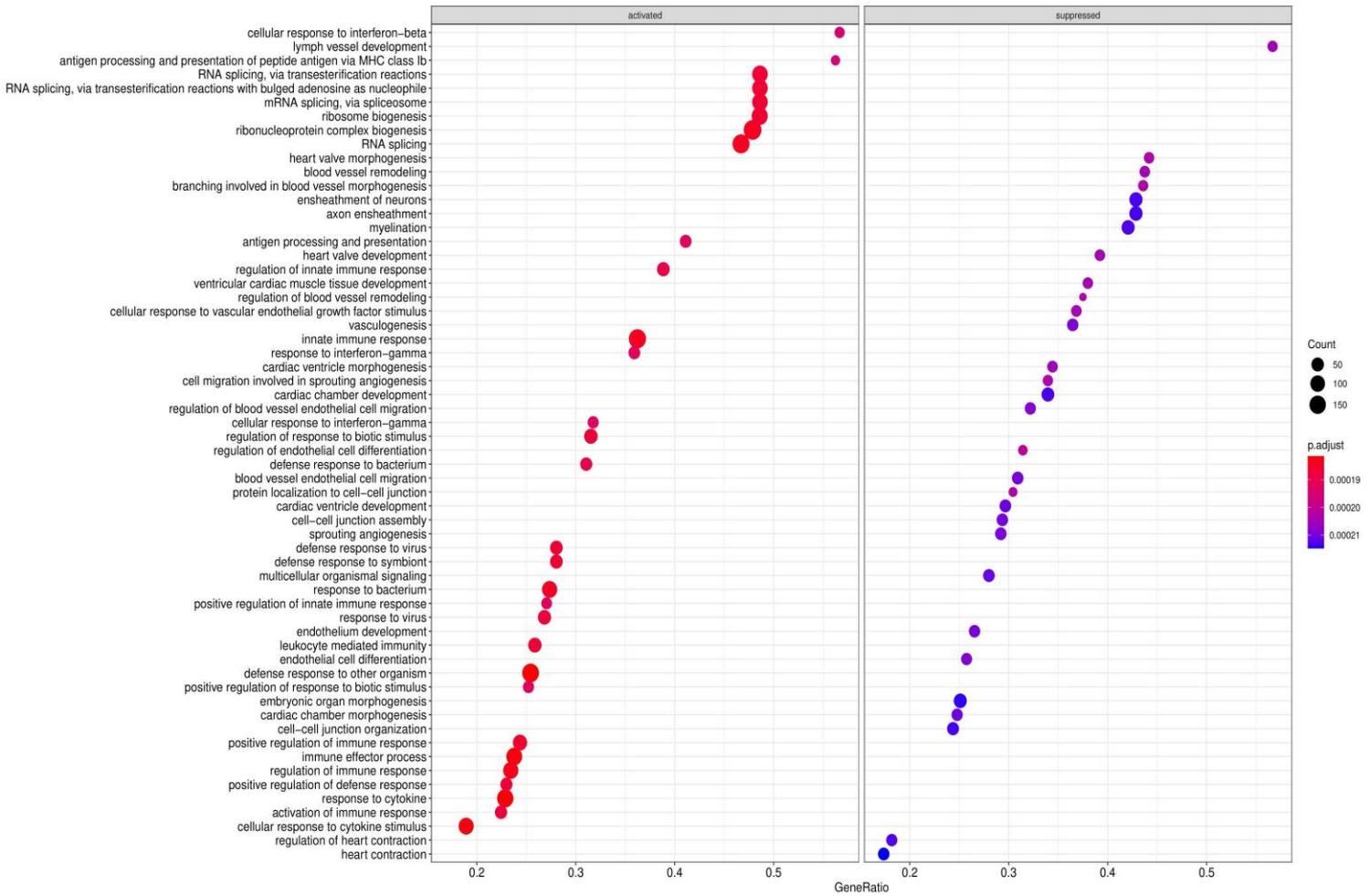


Figura 26: Dot plot V1XV3. O gráfico mostra as principais vias alteradas pelos genes diferencialmente expressos em V1XV3, pela sobreposição dos pontos. Na coluna da esquerda, onde são representadas as vias alteradas pelos genes ativados, foram observadas alterações principalmente em vias relacionadas ao sistema imune. Muitas vias foram enriquecidas positivamente no sentido dos processos do sistema imunológico e no combate à infecção. Nesse conjunto, há vias relacionadas à resposta a interferon, processamento e apresentação de antígeno, regulação da resposta imune, resposta a interferon gama, mecanismo de defesa a patógenos (especificamente bactérias e vírus), regulação da resposta imune inata e produção e resposta de citocinas. Vias relacionadas ao ciclo celular e material genético também foram ativadas, como de splicing de RNA e formação de DNA e RNA. Assim, quanto aos genes negativamente expressos, há destaque para aqueles responsáveis por modificações em vias de morfogênese e diferenciação de tecidos. As principais vias acometidas estão vinculadas à formação do sistema linfático, sistema cardiovascular, sistema nervoso e processo embrionário.

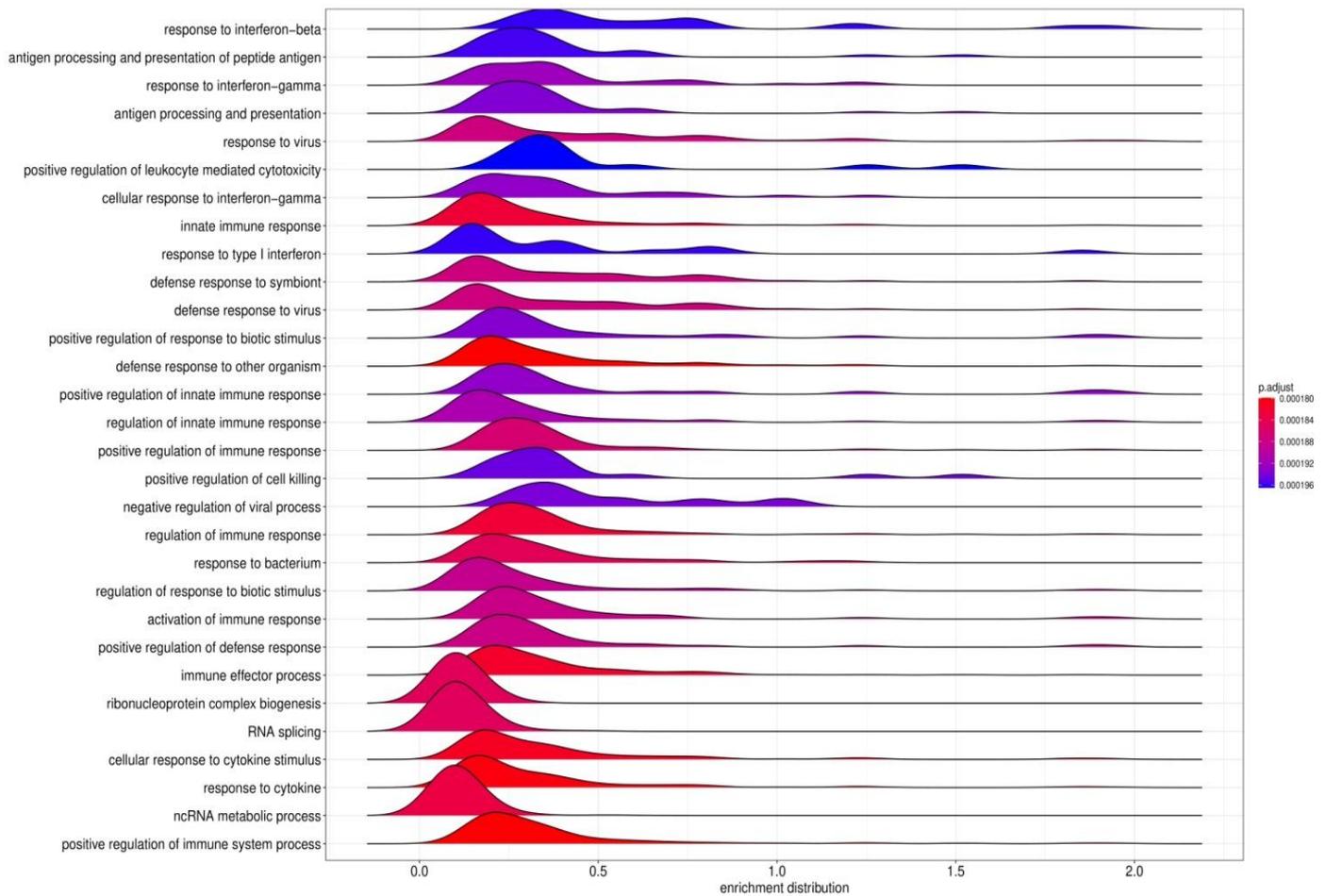


Figura 27: Ridge plot V1XV3. O gráfico mostra as principais vias alteradas pelos genes diferencialmente expressos em V1XV3, pela sobreposição de gráficos que mostram a intensidade da alteração na via. Foram observadas alterações principalmente em vias imunológicas, como de resposta a citocinas, processo de imunidade efetora, resposta de defesa à patógenos, resposta imune inata, regulação da resposta imune. Também foram ativadas vias de células NK, interferon tipo I, processamento e apresentação de antígeno, além de alteração em via de splicing de RNA.

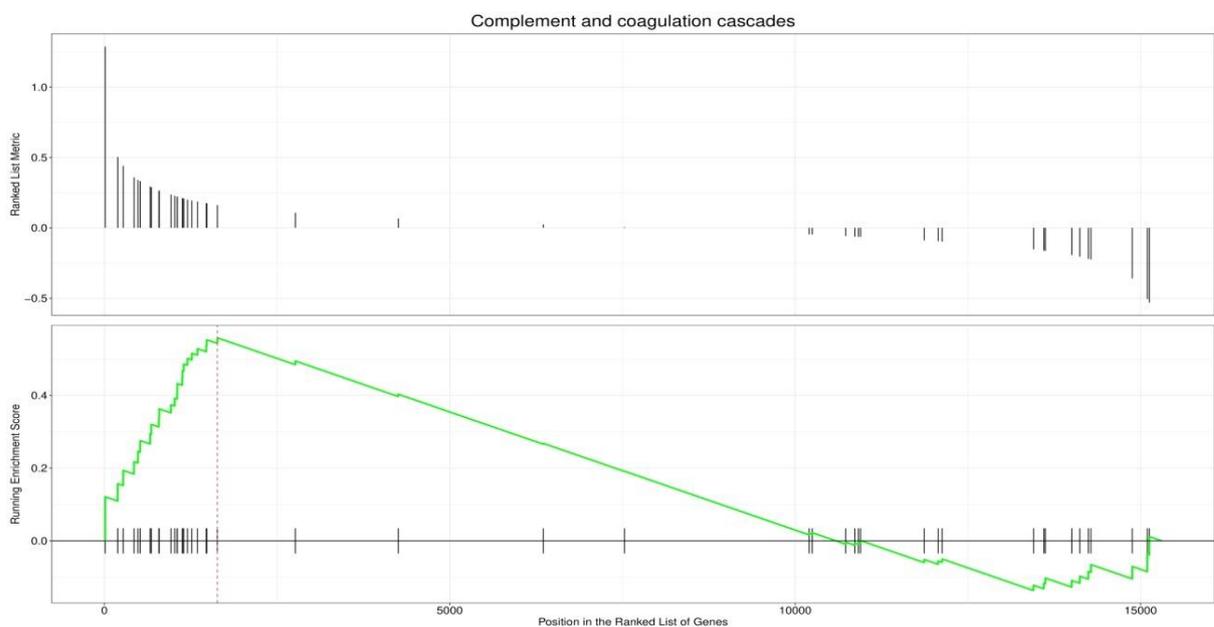


Figura 28: Gsea Plot para cascata de coagulação e sistema complemento V1XV3. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

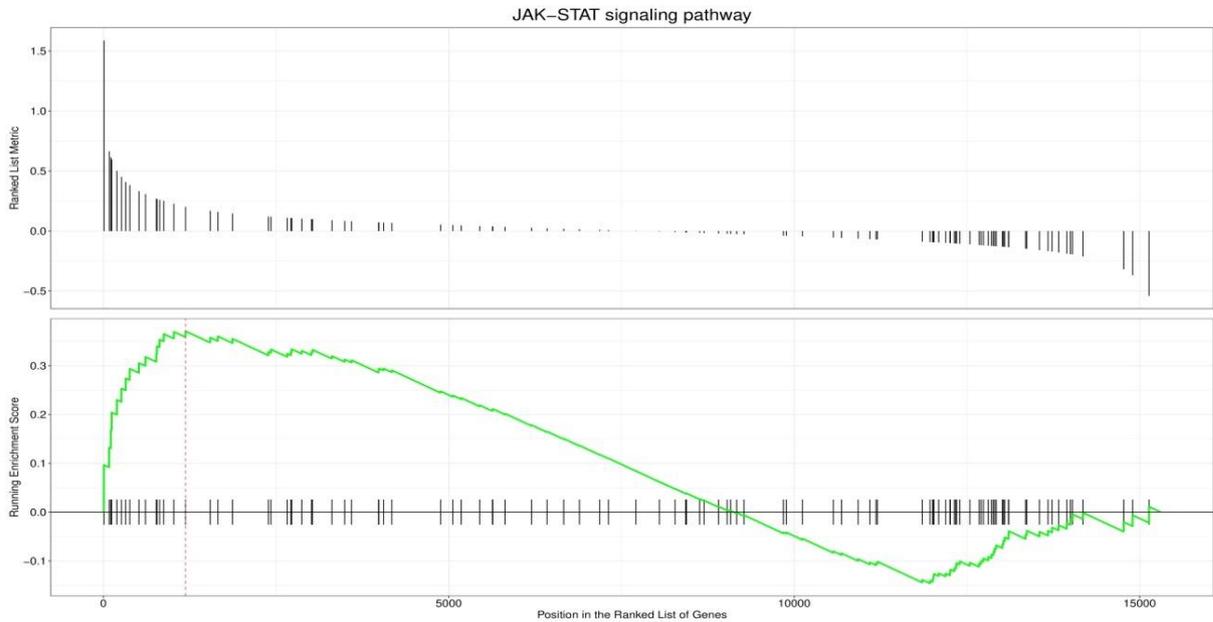


Figura 29: Gsea Plot para via de sinalização JAK-STAT V1XV3. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

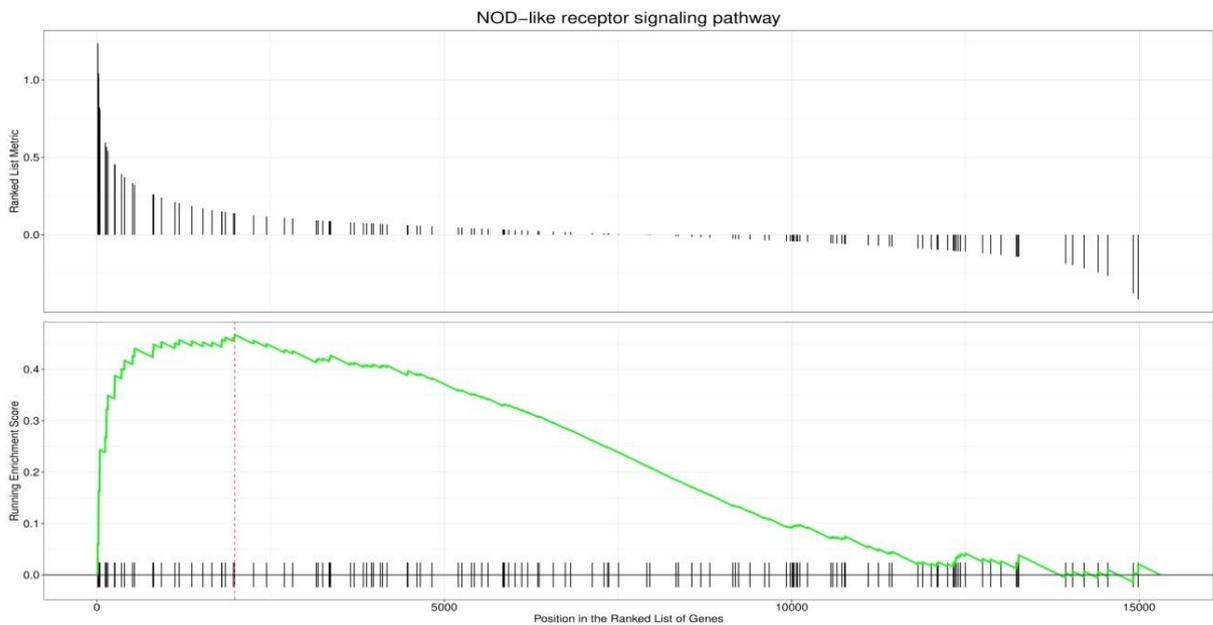


Figura 30: Gsea Plot para via de sinalização NOD-like V1XV3. O gráfico mostra enriquecimento positivo do conjunto genético para essa via, com pico acima de 0.

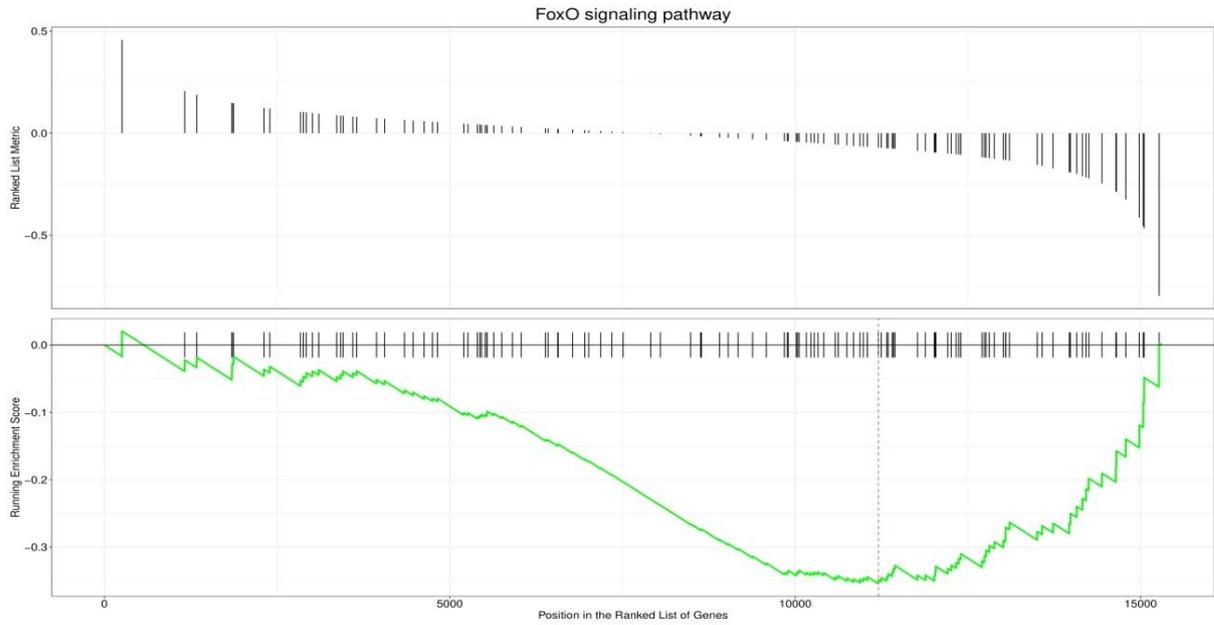


Figura 31: Gsea Plot para via de sinalização FoxO V1XV3. O gráfico mostra enriquecimento negativo do conjunto genético para essa via, com pico abaixo de 0.

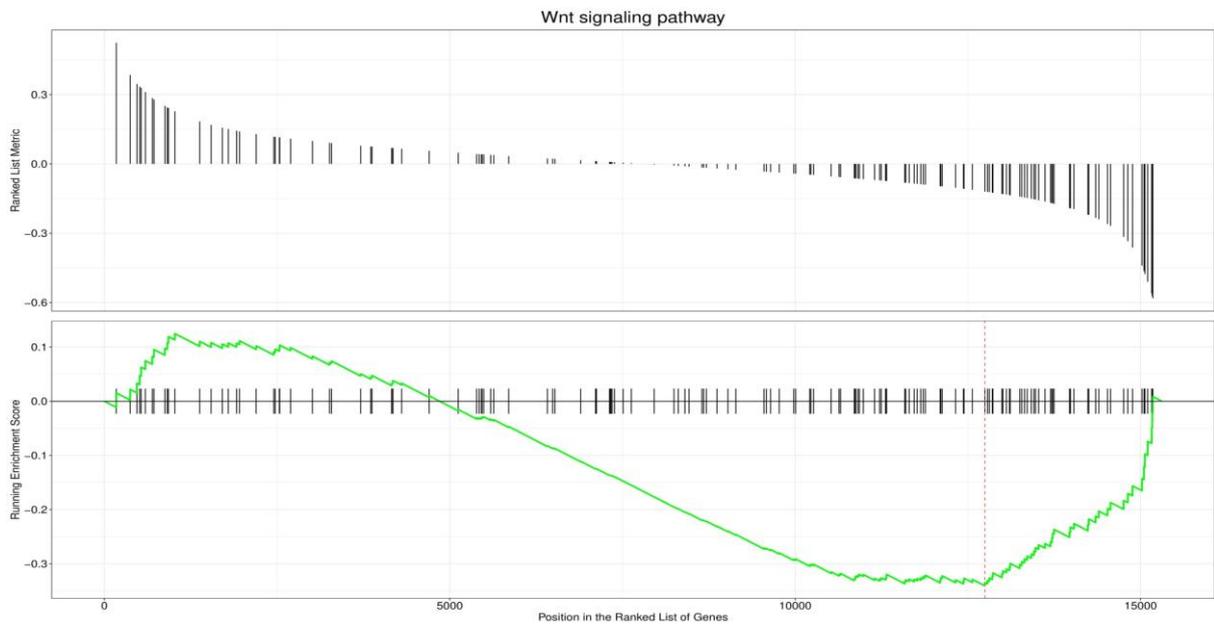


Figura 32: Gsea Plot para via de sinalização Wnt V1XV3. O gráfico mostra enriquecimento negativo do conjunto genético para essa via, com pico abaixo de 0.

Anexo B – Análise Funcional dos Genes Diferencialmente Expressos

Tabela 5: Análise da função dos genes diferencialmente expressos em V1XV2.

Gene	V1XV2		
	logFC	Proteína	Função
Gm12447	1,145336326	Gene previsto 12447	Não descrito
A630072M18Rik	1,139967726	Riken cDNA A630072M18	cDNA de timo de neonato
Slc9a4	-1,013084525	Trocador de sódio / hidrogênio 4	Regulação de pH, transdução de sinal, absorção de sódio
Prss56	-1,049779059	Serina protease 56	Desenvolvimento do olho
C1ql2	-1,232632723	Proteína 2 semelhante a C1q do complemento	Regulação do número de sinapses de neurônios do hipocampo
Scgn	-1,523558647	Secretagogin	Ligação de íons de cálcio
Gm37795	-1,561331713	Gene previsto 37795	Contém miRNAs

A tabela mostra a análise funcional dos genes diferencialmente expressos em V1XV2. É descrito o valor de logFC, o nome da proteína e a função de cada gene.

Tabela 6: Análise da função dos genes diferencialmente expressos em V2XV3.

Gene	V2XV3		
	logFC	Proteína	Função
Capn11	2,23746583	Calpaín-11	Tiol-protease regulada por cálcio, envolvidos na remodelação do citoesqueleto e transdução de sinal
Zbp1	1,939635305	Proteína 1 de ligação a Z-DNA	Reconhece estruturas de Z-RNA produzidos por vírus, desencadeando morte celular
Ifi2712a	1,878482318	Proteína 2A semelhante à interferon alfa induzível	Resposta vascular à lesão, regulação negativa induzida por interferon de atividade transcricional
Ifi204	1,680241705	Proteína ativável por interferon 204	Inibe a transcrição do RNA ribossômico
Ifi209	1,67160392	Gene ativado por interferon 209	Ativação da resposta imune inata, resposta celular ao interferon-beta
Avp	1,530022927	Vasopressina-neurofina 2-copeptina	Atua ligando-se aos receptores da vasopressina
Shisal2b	1,399918912	Proteína shisa-like-2B	Índice de massa corporal
Gm12250	1,253608777	GTPase p47 induzível por interferon gama	Ligação GTP
Gm45809	1,221330623	Gene previsto 45809	Não descrito
Lilra5	1,185900623	Receptor semelhante a imunoglobulina de leucócito, subfamília A	Regulação de produção de IL-12, IL-13, IL-10, IL-6, cascata MAPK, TNF
Nlrp1c-ps	1,162451743	Família NLR, domínio de pirina contendo 1C	Recrutamento de caspases, mediador chave de morte celular programada
Gm13778	1,143730253	Gene previsto 13778	Não descrito
Lgals3bp	1,141098015	Proteína de ligação à galectina-3	Promove a adesão celular mediada por integrinas
Tgtp1	1,11516732	Proteína 1 de ligação de trifosfato de guanina específica para células T	Envolvido na resistência celular autônoma inata a patógenos intracelulares
Gm37212	1,106978243	Gene previsto 37212	Não descrito
Il20ra	1,097229535	Subunidade alfa do receptor de interleucina-20	O dímero IL20RA / IL20RB é um receptor para IL19, IL20 e IL24 e IL20RA / IL10RB é um receptor para IL26
Npff	1,098357026	Neuropeptídeo FF relacionado à pró-FMRFamida	Peptídeos moduladores da morfina
Gm32633	1,085543294	Gene previsto	Não descrito
Gsx1	1,085543294	GS homeobox 1	Ativa a transcrição do gene GHRH, desempenha um papel importante no desenvolvimento da hipófise

Gm4951	1,06595561	Proteína GTPase Ifgga2 induzível por interferon gama	Atividade GTPase, resposta celular ao interferon-beta
H2-Q6	1,057293175	Antígeno MHC Classe Ib Qa-2	Processamento de antígeno e apresentação de antígeno de peptídeo endógeno via MHC classe Ib
Gm43389	1,028155546	Gene previsto 43389	Não descrito
Gm37795	1,025842524	Gene previsto 37795	Contém miRNAs
Gm37755	1,007736599	Gene previsto 37755	Contém miRNAs
9130227L01Rik	-1,000871664	Riken cDNA 9130227L01	Não descrito
Gm37019	-1,021938326	Gene previsto 37019	Não descrito
Gm44229	-1,031242346	Gene previsto 44229	Não descrito
Depp1	-1,040816184	Proteína DEPP1	Atua como um modulador crítico da autofagia induzida por FOXO3 via aumento de ROS celulares
Fos	-1,058073534	Proto-oncogene c-Fos	Papel no desenvolvimento das células destinadas a formar e manter o esqueleto
Egr2	-1,058558324	E3 SUMO-proteína ligase EGR2	Desempenha um papel na segmentação do cérebro posterior
Hmcn1	-1,081457036	Hemicentina-1	Promove a maturação do sulco de clivagem durante a citocinese em embriões pré-implantação
Magix	-1,086360127	Proteína MAGIX contendo domínio PDZ	Largura de distribuição do componente plaquetário
Ccn1	-1,088890699	Membro da família CCN 1	Promove a proliferação celular, quimiotaxia, angiogênese e adesão celular

A tabela mostra a análise funcional dos genes diferencialmente expressos em V2XV3. É descrito o valor de logFC, o nome da proteína e a função de cada gene.

Tabela 7: Análise da função dos genes diferencialmente expressos em V1XV3.

Gene	V1XV3		
	logFC	Proteína	Função
Gm21738	2,146112264	Gene previsto 21738	Não descrito
Gm26870	2,065016111	Gene previsto 26870	Pode estar relacionado com a expressão diferencial de receptores quimiossensoriais
Ifi2712a	1,992263948	Proteína 2A semelhante à interferon alfa induzível	Resposta vascular à lesão, regulação negativa induzida por interferon de atividade transcricional
Ifi209	1,938962073	Gene ativado por interferon 209	Ativação da resposta imune inata, resposta celular ao interferon-beta
Gm10800	1,866824173	Gene previsto 10800	Não descrito
Zbp1	1,853834436	Proteína 1 de ligação a Z-DNA	Reconhece estruturas de Z-RNA produzidos por vírus, desencadeando morte celular
Gm4951	1,810946943	Proteína GTPase Ifgga2 induzível por interferon gama	Atividade GTPase, resposta celular ao interferon-beta
Spo11	1,638776574	Proteína de recombinação meiótica SPO11	Componente de um complexo de topoisomerase necessário na recombinação meiótica
H2-Q6	1,518039633	Antígeno MHC Classe Ib Qa-2	Processamento de antígeno e apresentação de antígeno de peptídeo endógeno via MHC classe Ib
Six1	1,480514079	Proteína Homeobox SIX1	Fator de transcrição envolvido na regulação da proliferação celular, apoptose e desenvolvimento
Gm37755	1,364234613	Gene previsto 37755	Contém miRNAs
Gm12447	1,299452486	Gene previsto 12447	Não descrito
F5	1,288546353	Fator de coagulação V	Regulador central de hemostasia, cofator para a atividade da protrombinase
Gm11537	1,278276983	Gene previsto 11537	Não descrito
H2-Q7	1,255136769	Antígeno de histocompatibilidade H-2 classe I, cadeia alfa Q7	Apresentação de antígenos estranhos ao sistema imunológico
Ifi204	1,235139511	Proteína ativável por interferon 204	Inibe a transcrição do RNA ribossômico

Srpx	1,233029511	Proteína SRPX contendo repetição de sushi	Envolvido no processo de autofagia, regulação da proliferação celular e sinalização apoptótica
Nlrp1c-ps	1,225526975	Família NLR, domínio de pirina contendo 1C	Recrutamento de caspases, mediador chave de morte celular programada
Gm37132	1,208466738	Gene previsto 37132	Não descrito
Tgtp1	1,190751054	Proteína 1 de ligação de trifosfato de guanina específica para células T	Envolvido na resistência celular autônoma inata a patógenos intracelulares
Gm39456	1,174346737	Gene previsto 39456	Não descrito
Lgals3bp	1,152711478	Proteína de ligação à galectina-3	Promove a adesão celular mediada por integrinas
Mboat4	1,138129054	Ghrelin O-aciltransferase	Medeia a octanoilação de grelina em 'Ser-3'
Usp18	1,098275864	Hidrolase 18 do terminal carboxila Ubl	Envolvido na regulação da resposta inflamatória ao interferon tipo 1
Gm9916	1,067097832	Gene previsto 9916	Não descrito
G730003C15Rik	1,063538593	Riken cDNA G730003C15	Não descrito
Oas1b	1,043805661	2'-5'-oligoadenilato sintase 1B inativa	Exibe atividade antiviral contra flavivírus por via antiviral alternativa independente de RNase L
Has2	1,026973858	Hialuronano sintase 2	Essencial para a síntese de hialuronanos
Ccl12	1,016205448	Quimiocina 12 do motivo CC	Fator quimiotático que atrai eosinófilos, monócitos e linfócitos
Tmem154	-1,010020401	Proteína transmembrana 154	Não descrito
Depp1	-1,023506153	Proteína DEPP1	Atua como um modulador crítico da autofagia induzida por FOXO3 via aumento de ROS celulares
Slnf3	-1,039407041	Proteína contendo domínio AlB _A _2	Regulação negativa da proliferação da população celular
Kcnq1	-1,057153779	Canal de potássio controlado por voltagem subfamília KQT membro 1	Canal de potássio com papel importante em vários tecidos: coração, ouvido interno, estômago e cólon
Zfp473	-1,092007226	Proteína Zfp473	Regulação da transcrição, modelada por DNA
Gm39323	-1,133315889	Gene previsto 39323	Não descrito
Pcdh12	-1,133421036	Protocaderina-12	Molécula de adesão celular com papel nas interações célula-célula nas junções interendoteliais
Hmgn1	-1,149517566	Hemicentina-1	Promove a maturação do sulco de clivagem durante a citocinese em embriões pré-implantação
Rln1	-1,151878668	Prorelaxin 1	Papel na atividade hormonal
Gm15169	-1,182946573	Gene previsto 15169	Não descrito
Gm44229	-1,230151733	Gene previsto 44229	Não descrito
Magix	-1,231865988	Proteína MAGIX contendo domínio PDZ	Largura de distribuição do componente plaquetário
Gm9946	-1,505167269	Gene previsto 9946	Não descrito
Gm37629	-1,533734802	Gene previsto 37629	Não descrito

A tabela mostra a análise funcional dos genes diferencialmente expressos em V1XV3. É descrito o valor de logFC, o nome da proteína e a função de cada gene.