

**CAROLINA MANGANELI POLONIO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MICRORNAS NA  
IMUNOPATOGÊNESE DA MICROCEFALIA CAUSADA PELO  
ZIKA VÍRUS EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

São Paulo  
2022

**CAROLINA MANGANELI POLONIO**

**AVALIAÇÃO DO PAPEL DOS MICRORNAS NA  
IMUNOPATOGÊNESE DA MICROCEFALIA CAUSADA PELO  
ZIKA VÍRUS EM MODELOS EXPERIMENTAIS**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo, para obtenção do Título de Doutor em Ciências.

Área de concentração: Imunologia

Orientador: Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron

Versão Original

São Paulo  
2022

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)  
Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Manganeli Polonio, Carolina

Avaliação do papel dos microRNAs na  
imunopatogênese da microcefalia causada pelo Zika  
vírus em modelos experimentais / Carolina Manganeli  
Polonio; orientador Jean Pierre Schatzmann Peron. -  
- São Paulo, 2022.

126 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,  
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Zika vírus. 2. Astrócitos. 3. microRNAs. 4.  
neurodesenvolvimento. 5. autofagia. I. Schatzmann  
Peron, Jean Pierre , orientador. II. Título.

**Aos meus pais Pedro e Marisa, minha  
irmã Tamires, e minha tia Marta, com  
todo amor e gratidão. Por  
proporcionarem a realização de sonhos e  
sempre acreditarem em mim.**

**Vocês são meu coração fora do peito.**

## **AGRADECIMENTOS**

Aos meus pais Pedro e Marisa, e minha irmã Tamires, que são meus maiores exemplos de conduta e, que me moldaram para ser alguém que me orgulho. Por me alicerçarem todos os dias e me proporcionarem a oportunidade de seguir meus sonhos. Embora agora estejamos em continentes diferentes, meu coração sempre estará com vocês;

Ao Prof. Dr. Jean Pierre Schatzmann Peron, meu orientador, companheiro e amigo, por todo apoio científico e psicológico, pela confiança, pela liberdade e principalmente pela parceria. Meu sincero agradecimento por tornar todos os dias difíceis mais leves e pela dedicação diária em tentar nos tornar cada vez mais sábios. Sua paixão por tudo o que você faz me inspira diariamente a continuar;

Ao João Vinícius Peron, mesmo tão novo, pequeno e com uma vida pela frente, você me ensina todos os dias sobre amor incondicional, sobre como ser uma pessoa melhor e, sobre se doar e receber tanto amor de volta. Eu espero poder te proporcionar a oportunidade de você seguir seus sonhos e se tornar cada dia mais uma pessoa a qual você se orgulhe;

À tia Marta, por dar todo seu amor e afeto e por me passar todos os seus princípios, auxiliando na formação do meu caráter e estando comigo sempre;

À avó Ida, pelo simples fato de não existir colo mais aconchegante que o seu. Eternas saudades;

Ao avô Manuel, por dedicação total e imenso carinho à família. Você é o exemplo de força. 100 anos não é pra qualquer um;

Aos meus primos Amanda, Joice, Clayton, Guilherme e Talita agradeço por todos os anos juntos e todo amor e gratidão que sentimos;

À Larissa e Laura que são as pessoas mais importantes em nossas vidas, um amor imensurável por essas duas riquezas;

Ao meu cunhado Rafael, por fazer minha irmã e toda família muito feliz;

Aos tios Adail e Eliana, que apesar de não sermos “de sangue”, me acolheram com tanto afeto e auxiliaram meus pais em minha formação e caráter;

À minha amiga Tuany, por sermos tão diferentes, por sempre caminharmos juntas e nunca desistirmos uma da outra;

À Andrea e Drielly, por caminharem junto a mim em todos os momentos. Somos o exemplo que amizade verdadeira não esmorece com o tempo;

À Nayane e Tais, por termos alicerçado uma a outra em um dos momentos mais difíceis de nossas vidas. Obrigada pelo respeito, pelas alegrias e pela força, que venham muitos anos de parceria pela frente;

À Nagela, Lilian e Marília, por todo apoio, amizade e parceria. Nosso companheirismo foi essencial para eu seguir em frente durante todos esses anos. A vida de cientista é bem frustrante, mas ter tido vocês ao meu lado, com certeza tornou essa jornada bem mais simples e leve. Obrigada pelas pizzas, churrascos, bebedeiras e momentos inesquecíveis que vivemos juntas;

Ao Nilton Barreto dos Santos, um incrível cientista e amigo que perdemos durante a luta contra a pandemia do SARS-CoV-2. Durante todos esses anos, eu aprendi imensamente com você Nilton. Esteja onde estiver, você sempre será lembrado por nós;

À Ariana, Lucas e Heitor, por serem tão presentes e parceiros. Nossa amizade é longa e vai perdurar por muito mais anos, independentemente da distância. Obrigada por me deixarem acompanhar o crescimento dessa riqueza chamada Heitor. Ari, você é minha irmã de alma;

À Mayara e João, os quais apareceram na minha vida tão naturalmente e hoje, não consigo mais me imaginar sem a amizade de vocês;

À Jessica e Larissa, pela parceira em momentos de tanta fragilidade, por terem me feito sentir parte de um lugar, e por terem se tornado minha família. Vocês foram como irmãs para mim durante esse tempo em Boston;

Ao Prof. Dr. Francisco Quintana e à Dra. Liliana Sanmarco, por terem aberto as portas do laboratório, por tantos ensinamentos e, principalmente por terem me tornado uma cientista melhor;

À Dra. Sandra Muxel, minha parceira dos miRNAs. Sem você, eu nunca teria chegado tão longe. Obrigada por acreditar em mim e contribuir imensamente com a minha formação científica, além de ser uma excelente amiga;

Aos velhos e novos colegas de laboratório, Carla, Cristiano, Wesley, David, Yan, Laura, Tiago, Patrick, Brendo e Jonathan, por todo auxílio científico, convívio excepcionalmente agradável, uma vez que nos tornamos amigos. Esse trabalho é fruto do nosso trabalho em equipe;

Aos colegas pós-graduandos do ICB, Igor Santiago, Rafael Salgado, Aline Arruda, Tiago Patente, João Pedro Torres e, Flávia Sardela, por fazerem parte da minha vida, por torcerem por mim, pela parceria e com certeza por todos os momentos incríveis que vivemos juntos;

À minha banca de qualificação: Profa. Dra. Maria Sato, Dr. Sandra Muxel e Prof. Dr. Bruna Alencar, por todas as sugestões;

Aos funcionários Maria Eni, Claudia, Aurea e Sandra, obrigada por nos aturarem diariamente e nos proporcionarem condições melhores de trabalho;

Ao Departamento de Imunologia da Universidade de São Paulo e todos os funcionários, por me proporcionarem uma experiência única durante o meu mestrado e doutorado.

## **APOIO FINANCEIRO**

Agradecimento à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo financiamento durante o doutorado e o estágio no exterior de Carolina Manganeli Polonio, nº USP 9565150. Processos FAPESP: 2017/11828-0 e 2019/13731-0.



***“Em algum lugar, alguma coisa incrível está esperando para ser descoberta”.***

**(Carl Sagan)**

***“Ciência e vida cotidiana não podem e não devem ser separadas”.***

**(Rosalind Franklin)**

## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	12
<b>ABSTRACT</b> .....	13
<b>LISTA DE FIGURAS</b> .....	14
<b>LISTA DE TABELAS</b> .....	17
<b>LISTA DE ABREVIÇÕES</b> .....	18
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	22
1.1. Zika vírus .....	22
1.2. ZIKV e alterações neurológicas .....	24
1.3. Suscetibilidade e resistência ao ZIKV .....	28
1.4. microRNAs .....	29
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	34
2.1. Objetivos gerais .....	34
2.2. Objetivos específicos .....	34
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	35
3.1. Animais .....	35
3.2. Cultivo e amplificação viral .....	35
3.3. Titulação viral em PFU .....	36
3.4. Cultivo de astrócitos primários murinos .....	36
3.5. Infecção pelo ZIKV <i>in vitro</i> e <i>in vivo</i> .....	37
3.6. Estimulação dos astrócitos .....	37
3.7. Imunofluorescência .....	37
3.8. Extração de RNA e síntese de cDNA .....	38
3.9. Quantificação por PCR em tempo real .....	39
3.10. Análise do perfil de miRNAs .....	41
3.11. Análise de predição das interações mRNA-miRNA .....	41
3.12. Uso de miRNAs inibidores e mímicos .....	41
3.13. Uso de RNA de interferência ( <i>siRNA</i> ) .....	42
3.14. Construtos pmiRGLO e ensaio de luciferase .....	42
3.15. Western Blotting (WB) .....	44
3.16. <i>Cell sorting</i> de astrócitos murinos .....	44
3.17. Citometria de fluxo .....	45
3.18. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP) .....	46
3.19. Histologia do cérebro de neonatos .....	47
3.20. Sequenciamento de RNA do cérebro de neonatos .....	47
3.21. Mapeamento de bibliotecas de RNA-seq e análise de expressão gênica diferencial ..	48
3.22. Reconstrução do <i>network</i> entre mRNAs-miRNAs .....	49
3.23. Análise estatística .....	49

<b>4.</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	50
4.1.	ZIKV é capaz de modular o perfil de miRNAs no cérebro de animais nascidos de mães infectadas .....	50
4.2.	Predição dos genes modulados pelos miRNAs regulados pelo ZIKV no cérebro de animais nascidos de mães infectadas .....	51
4.3.	Avaliação da expressão do mRNA-alvos dos miRNAs regulados pelo ZIKV no cérebro de animais nascidos de mães infectadas .....	53
4.4.	ZIKV aumenta a expressão de miR-295 para diminuir <i>Bcl2/11</i> e favorecer a autofagia no cérebro de filhotes SJL .....	54
4.5.	A infecção pelo ZIKV estimula autofagia mediada pelas interações mRNA/miRNAs ...	56
4.6.	Padronização do cultivo de astrócitos primários de neonatos murinos e a capacidade do ZIKV infectá-los .....	57
4.7.	ZIKV é capaz de modular o perfil de miRNAs para favorecer a autofagia em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	59
4.8.	Predição dos genes modulados pelos miRNAs regulados pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	62
4.9.	Avaliação da expressão do mRNA alvos dos miRNAs regulados pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	63
4.10.	ZIKV aumenta a expressão de miR-295 e miR-302d para reprimir <i>Ahrr</i> e estimular a via de AHR .....	64
4.11.	ZIKV aumenta a expressão de miR-295 e miR-302d para diminuir os genes <i>Neurod4</i> e <i>Neurod6</i> e, conseqüentemente, o neurodesenvolvimento .....	69
4.12.	ZIKV promove a transcrição de <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> e, conseqüentemente, dos miR-295 e miR-302, respectivamente .....	72
4.13.	ZIKV induz a expressão de C/EBP $\beta$ e p65 para promover a transcrição de <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> e, conseqüentemente, aumentar os níveis de miR-295 e miR-302d .....	74
4.14.	C/EBP $\beta$ , p65, NLRP12, LARP7, miR-295 e miR-302d são fatores responsáveis pela suscetibilidade à infecção pelo ZIKV .....	81
<b>5.</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	83
<b>6.</b>	<b>CONCLUSÕES</b> .....	94
<b>7.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	95
<b>8.</b>	<b>REALIZAÇÕES DURANTE O DOUTORADO</b> .....	107
8.1.	Artigos publicados durante o doutorado relacionados à tese .....	107
8.2.	Artigos publicados durante o doutorado não relacionados à tese .....	107
8.3.	Prêmios associados à essa tese .....	108
<b>9.</b>	<b>ANEXOS</b> .....	109

## RESUMO

POLONIO, C.M. **Avaliação do papel dos microRNAs na imunopatogênese da microcefalia causada pela Zika vírus em modelos experimentais.** Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, 2022.

O Zika Vírus (ZIKV) é um flavivírus que causa comprometimento neurológico caracterizando a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ). Embora as células precursoras neuronais e os neurônios sejam as células mais afetadas, os astrócitos são mais suscetíveis à infecção pelo ZIKV, uma vez que toleram maiores cargas virais, sofrem menos apoptose e são utilizados para replicação viral. Vários reguladores de processos biológicos estão envolvidos na suscetibilidade à SCZ, incluindo os microRNAs (miRNAs). Os miRNAs são pequenos RNAs não codificantes que interagem com sequências alvo de mRNA complementares para repressão pós-transcricional. Nesse contexto, o objetivo principal é investigar as interações miRNAs-mRNA durante a transmissão vertical do ZIKV, com foco em astrócitos. Primeiramente, demonstramos que o ZIKV aumenta a expressão miRNAs no cérebro total de camundongos neonatos nascidos de mães infectadas, estimulando a autofagia. A regulação positiva do miR-295 limita a expressão do gene regulador da autofagia *Bcl2l11* *in vivo* e em astrócitos *in vitro*. Além disso, comparando o perfil de miRNAs em astrócitos primários de camundongos SJL, observamos o aumento da expressão dos miR-295 e miR-302d. Utilizando plataformas bioinformáticas, mimetizadores e inibidores dos miRNAs, e ensaio de luciferase, demonstramos que os genes *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* são regulados negativamente pelos miR-295 e miR-302d. Curiosamente, os miR-295 e miR-302d são transcritos juntamente com os genes *Nlrp12* e *Larp7*, respectivamente. E para entender melhor o mecanismo usado pelo ZIKV para induzir estes miRNAs, avaliamos fatores que levam a transcrição dos genes *Nlrp12* e *Larp7*. De modo interessante, o ZIKV aumentou a expressão dos fatores de transcrição CEBP/β e da subunidade p65 de NF-κB. Corroborando, o ZIKV induziu o recrutamento de CEBP/β para o promotor de *Nlrp12* e *Larp7* e p65 para o promotor de *Larp7*. Ainda, a inibição de *Rela* e *Cebpb* por siRNAs, diminuiu *Nlrp12*, *Larp7*, *premiR-295*, *premiR-302d*, miR-295 e miR-302d, enquanto aumentou a expressão dos genes *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6*. Em seguida, demonstramos que a ativação dessa via descrita é um mecanismo de suscetibilidade à SCZ, uma vez que não observamos aumento da expressão de *Cebpb*, *Rela*, *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, miR-295 e miR-302d, e dos seus genes alvos, *Ahrr*, *Neurod4*, *Neurod6* em astrócitos de camundongos C57BL/6 WT resistentes à microcefalia causada pelo ZIKV. Dessa forma, demonstramos que o ZIKV ativa os fatores de transcrição C/EBPβ e NF-κB para aumentar a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente, dos miR-295 e miR-302d em astrócitos SJL. Estes miRNAs levam à diminuição da expressão dos genes *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6*, contribuindo para o desenvolvimento de SCZ em camundongos SJL suscetíveis, mas não em camundongos C57BL/6 WT resistentes. Em conjunto, sugerimos um mecanismo de suscetibilidade ao desenvolvimento da SCZ.

**Palavras chaves:** Zika vírus, astrócitos, microRNAs, autofagia, neurodesenvolvimento, suscetibilidade, SCZ.

## ABSTRACT

POLONIO, C.M. **Evaluation of microRNAs in the immunopathogenesis of microcephaly caused by Zika virus in experimental models.** PhD Thesis. Biomedical Sciences Institute, University of Sao Paulo, 2022.

The Zika Virus (ZIKV) is a flavivirus that leads to neurological impairment characterizing the Congenital ZIKV Syndrome (CZS). Although neuronal precursor cells and neurons are the most affected cells, astrocytes are more susceptible to ZIKV infection, once tolerate higher viral loads, suffer less apoptosis and are used for viral replication. Curiously, it is known that several regulators of biological processes are involved in the susceptibility to CZS, including microRNAs (miRNAs). MiRNAs are small non-coding RNAs, which work downstream of transcription factors by interacting with complementary mRNA target sequences for further post-transcriptional repression. In this context, the principal aim is investigated miRNAs-mRNA interactions during vertical transmission of ZIKV, focusing on astrocytes. First, we demonstrated that ZIKV increases miRNAs expression in the brain of mice neonates from infected mothers, stimulating autophagy. Upregulation of miR-295 limits the expression of *Bcl2l11*, an autophagy regulator gene, *in vivo* and in astrocytes *in vitro*. Furthermore, comparing miRNAs profile in SJL astrocytes, we observed an increased expression of miR-295 and miR-302d. Using bioinformatics platforms, miRNAs mimics and inhibitors, and luciferase assay, we demonstrated that *Ahrr*, *Neurod4* and *Neurod6* genes are downregulated by miR-295 and miR-302d. Interestingly, miR-295 and miR-302d are transcribed along with *Nlrp12* and *Larp7* genes, respectively. To better understand the mechanism used by ZIKV to induce miRNAs, we evaluated transcription factors for *Nlrp12* and *Larp7* transcription. Interestingly, ZIKV increased the expression of CEBP/β and NF-κB p65 subunit. Corroborating, ZIKV induced the recruitment of CEBP/β to *Nlrp12* and *Larp7* promote, p65 to *Larp7* promoter. Moreover, *Rela* and *Cebpb* inhibition by siRNAs decreased *Nlrp12*, *Larp7*, *premiR-295*, *premiR-302d*, miR-295 and miR-302d, while increased *Ahrr*, *Neurod4* and *Neurod6* gene expression. Following, we demonstrate that the activation of this described pathway is a susceptibility mechanism to CZS, since we did not observe increased expression of *Cebpb*, *Rela*, *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, miR-295 and miR-302d, and their target genes, *Ahrr*, *Neurod4*, *Neurod6* in astrocytes from C57BL/6 WT resistant mice to microcephaly caused by ZIKV. Thus, we demonstrate that ZIKV activates transcription factors C/EBPβ and NF-κB to increase transcription of *Nlrp12* and *Larp7*, and consequently, miR-295 and miR-302d in SJL astrocytes. These miRNAs lead to decreased expression of *Ahrr*, *Neurod4* and *Neurod6* genes, contributing to CZS development in susceptible SJL mice, but not in resistant C57BL/6 WT mice. Together, we suggest a mechanism of susceptibility to CZS development.

**Keywords:** Zika virus, astrocytes, microRNAs, autophagy, neurodevelopment, susceptibility, CZS.

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Visão geral da biogênese de miRNAs .....	31
<b>Figura 2.</b> Estratégia de <i>gate</i> para o isolamento de astrócitos por <i>cell sorting</i> .....	45
<b>Figura 3.</b> Estratégia de <i>gate</i> para análise da proteína AhRR por citometria de fluxo .....	46
<b>Figura 4.</b> Transmissão vertical pelo ZIKV .....	50
<b>Figura 5.</b> ZIKV modula o perfil de miRNAs no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas .....	51
<b>Figura 6.</b> Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV envolvidos na resposta imune antiviral no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas .....	54
<b>Figura 7.</b> Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV relacionados com morte celular e neurodesenvolvimento no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas.....	54
<b>Figura 8.</b> ZIKV aumenta o miR-295 para regular negativamente o mRNA <i>Bcl2/11</i> no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas .....	55
<b>Figura 9.</b> ZIKV modula o perfil de miRNAs para estimular a autofagia no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas .....	57
<b>Figura 10.</b> Pureza da cultura de astrócitos primários de neonatos de SJL .....	58
<b>Figura 11.</b> ZIKV é capaz de infectar astrócitos primários de neonatos de SJL .....	59
<b>Figura 12.</b> miRNAs regulados pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	60
<b>Figura 13.</b> ZIKV aumenta miR-295 para regular negativamente o mRNA <i>Bcl2/11</i> em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	61
<b>Figura 14.</b> ZIKV aumenta miR-295 para regular negativamente o mRNA <i>Bcl2/11</i> durante sua transmissão vertical e em astrócitos de SJL .....	61
<b>Figura 15.</b> Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV envolvidos na resposta imune antiviral em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	63
<b>Figura 16.</b> Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV relacionados com neurodesenvolvimento em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	63
<b>Figura 17.</b> Os miR-295 e miR-302d inibidores aumentam a expressão do mRNA <i>Ahrr</i> em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	64
<b>Figura 18.</b> Validação da inibição dos miRNAs .....	65
<b>Figura 19.</b> Os miR-295 e miR-302d mímicos diminuem a expressão do mRNA <i>Ahrr</i> .....	66

<b>Figura 20.</b> Validação do uso dos miRNAs mímicos .....	66
<b>Figura 21.</b> Os miR-295 e miR-302 regulam negativamente o mRNA <i>Ahrr</i> .....	67
<b>Figura 22.</b> Os miR-295 e miR-302d inibidores diminuem a ativação de AHR em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	68
<b>Figura 23.</b> A inibição do AHR reduz a patologia causada pela infecção do ZIKV em neonatos nascidos de mães infectadas .....	69
<b>Figura 24.</b> Os miR-295 e miR-302d inibidores aumentam a expressão dos mRNAs <i>Neurod4</i> e <i>Neurod6</i> em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	70
<b>Figura 25.</b> Os miR-295 e miR-302d mímicos diminuem a expressão dos mRNAs <i>Neurod4</i> e <i>Neurod6</i> .....	71
<b>Figura 26.</b> Os miR-295 e miR-302 regulam negativamente os mRNAs <i>Neurod4</i> e <i>Neurod6</i> ...	72
<b>Figura 27.</b> ZIKV promove a transcrição de <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> , e conseqüentemente dos miR-295 e miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	73
<b>Figura 28.</b> ZIKV promove a transcrição de <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> , mas não dos miRNAs da mesma família dos miR-295 e miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	74
<b>Figura 29.</b> ZIKV promove a ativação de C/EBP $\beta$ para transcrever <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> , e conseqüentemente os miR-295 e miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	75
<b>Figura 30.</b> ZIKV promove a ativação de NF- $\kappa$ B para transcrever <i>Larp7</i> , e conseqüentemente o miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	75
<b>Figura 31.</b> Análise da expressão gênica em astrócitos primários de neonatos de SJL em cinética de infecção pelo ZIKV .....	76
<b>Figura 32.</b> ZIKV induz ativação de CEBP/ $\beta$ e NF- $\kappa$ B para promover a transcrição de <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> e, conseqüentemente dos miR-295 e miR-302d para modular resposta imune e neurodesenvolvimento em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	77
<b>Figura 33.</b> A ativação da via CEBP/ $\beta$ , NF- $\kappa$ B, NLRP12, LARP7, miR-295 e miR-302d não é dependente da ativação de IFNAR-1 .....	78
<b>Figura 34.</b> A ativação da via CEBP/ $\beta$ , NF- $\kappa$ B, NLRP12, LARP7, miR-295 e miR-302d não é dependente da ativação de TLR3 .....	79
<b>Figura 35.</b> ZIKV induz ativação de CEBP/ $\beta$ e NF- $\kappa$ B para promover a transcrição de <i>Nlrp12</i> e <i>Larp7</i> e, conseqüentemente dos miR-295 e miR-302d para modular resposta imune e	

neurodesenvolvimento em astrócitos isolados de neonatos nascidos de mães SJL infectadas..... 80

**Figura 36.** Expressão gênica de astrócitos primários de neonatos de C57BL/6 WT ..... 81

**Figura 37.** Mecanismo de susceptibilidade e resistência perante a infecção pelo ZIKV ..... 82



## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Lista de primers para avaliação de mRNA .....	39
<b>Tabela 2.</b> Lista de primers para avaliação de miRNAs .....	40
<b>Tabela 3.</b> Lista de sequências inseridas no vetor para o ensaio de luciferase .....	42
<b>Tabela 4.</b> Lista dos primers que foram utilizados nos experimentos de CHIP .....	47
<b>Tabela 5.</b> Genes alvos preditos dos miRNAs regulados negativamente pelo ZIKV no cérebro de filhotes .....	52
<b>Tabela 6.</b> Genes alvos preditos dos miRNAs regulados positivamente pelo ZIKV no cérebro de filhotes .....	52
<b>Tabela 7.</b> Genes alvos preditos dos miRNAs regulados positivamente pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL .....	62

## LISTA DE ABREVIações

- AaVA-1 - Alérgeno-1 do veneno do *Aedes aegypti*
- AGO – Argonauta
- AHR – do inglês - *Aryl hydrocarbon receptor*
- AHRR – do inglês - *Aryl hydrocarbon receptor repressor*
- ARNT – do inglês - *Aryl hydrocarbon receptor nuclear translocators*
- BCL2 – do inglês - *B cell lymphoma 2*
- BCL2L11 – do inglês – *BCL2 like 11*
- BECN1 – do inglês – *Beclin1*
- BHE – Barreira Hematoencefálica
- C – Capsídeo
- cDNA – DNA complementar
- CEBP/β - do inglês – *CCAAT/enhancer-binding protein beta*
- ChIP – do inglês – *Chromatin Immunoprecipitation*
- cm – Centímetro
- CMC - Carboximetilcelulose
- CP – do inglês - *Cortical Plate*
- CRL – do inglês - *Crown-rump length*
- CSF – do inglês - *Cerebrospinal Fluid*
- DENV - Dengue vírus
- DEPC – do inglês - *Diethylpyrocarbonate*
- DGRC8 – do inglês - *DiGeorge Syndrome Critical Region Gene*
- DMEM – do inglês - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*
- DNA – ácido desoxirribonucleico
- dsRNA – RNA de fita dupla
- E – Dia embrionário
- EB – do inglês - *Embryonic Bodies*
- EBOV – Ebola Vírus
- EBV – Vírus Epstein-Barr
- eIF4E/eIF4G – do inglês - *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E/4G*
- Env – Envelope

ESCs – do inglês - *Embryonic Stem Cells*

Espin – Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional

FFU – do inglês – *Focus Forming Unit*

h – Horas

HBSS – do inglês – *Hank's Balanced Salt Solution*

HCV – do inglês - *Hepatitis C Virus*

HCV – do inglês - *Hepatitis C Virus*

HIV - do inglês - *Human Immunodeficiency Virus*

HO-1 – do inglês - *Heme oxygenase-1*

HP163 – do inglês - *Hercules Pharmaceuticals 163*

IFN – Interferon

IFN I – Interferon tipo I

IFNAR – do inglês - *Interferon-alpha receptor*

IL – Interleucina

IRAK – do inglês - *Interleukin-1 receptor-associated kinase 1*

IRF – do inglês – *Interferon regulatory factors*

ISG – do inglês - *Interferon Stimulated Genes*

IUGR – do inglês - *Intrauterine Growth Restriction*

JEV – do inglês - *Japanese Encephalitis Virus*

KEGG – do inglês - *Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes Database*

KPNA2 – do inglês - *Karyopherin subunit alfa 2*

LARP7 – do inglês - *La Ribonucleoprotein 7*

Luc2 – do inglês – *Firefly luciferase*

MCPH - do inglês – *Microcephaly Primary Hereditary*

min – Minutos

miR- microRNAs

miRISC – do inglês - *miRNA-Containing RNA-induced Silencing Complex*

miRNAs – microRNAs

Mis – Mismatch

mL – Mililitros

mm - milimolar

MOI – do inglês - *Multiplicity of infection*

mRNA – RNA mensageiro

mTOR - do inglês - *Mechanistic Target of Rapamycin Kinase*

Nav2 – do inglês - *Neuron Navigator 2*

NeuroD – do inglês - *Neurogenic Differentiation*

NF- $\kappa$ B – do inglês – *Nuclear factor kappa B*

NLRP12 – do inglês – *NLR Family Pyrin Domain Containing 12*

nM – nanomolar

NPCs – do inglês - *Neuronal Precursor Cells*

NS – do inglês – *Non-structure*

NT – do inglês, *Non-targeting*

OMS – Organização Mundial de Saúde

p-bodies – Corpúsculos de Processamento de RNA

PABPC1 – do inglês - *Poli-A Binding Protein C1*

PCR – do inglês - *Polymerase Chain Reaction*

PEG – Polietilenoglicol

PFA – Paraformaldeído

PFU – do inglês - *Plate Forming Unit*

pH – Potencial hidrogeniônico

PITA – do inglês - *Probability of Interaction by Target Accessibility*

Poly (I:C) - do inglês - *Polyinosinic:polycytidylic acid*

Pr-M – Pré-membrana

pré-miR – microRNA precursor

pri-miR – microRNAs primários

qPCR – PCR quantitativo

RAN-GTP – Proteína nuclear RNA de ligação a GTP

Rluc – Renilla luciferase

RN – Rio Grande do Norte

RNA – ácido ribonucleico

RNA-seq – Sequenciamento de RNA

RNF125 – do inglês - *Ring Finger Protein 125*

RPMI - do inglês - *Roswell Park Memorial Institute*

RSV – do inglês - *Respiratory Syncytial Virus*  
s.c. – subcutâneo  
SBF – Soro Bovino Fetal  
SCZ – Síndrome Congênita do Zika vírus  
SD – do inglês - *Standard Deviation*  
seg – segundos  
siRNA – RNA de interferência  
SJL – do inglês – *Swiss James Lambert*  
SNC – Sistema Nervoso Central  
SOCS-1 – do inglês - *Suppressor of Cytokine Signaling-1*  
STAT – do inglês - *Signal transducer and activator of transcription 2*  
T – Subcultura  
TAM – do inglês - *Tyro3, AXL, MertK*  
TBK1 - do inglês - *TANK-binding kinase 1*  
TGFBR1 – do inglês - *Transforming Growth Factor Beta Receptor 1*  
TLR – do inglês - *Toll-like Receptor*  
TNFA – do inglês - *Tumor necrosis fator alpha*  
TRAK2 – do inglês - *Trafficking Kinesin Protein 2*  
TRBP – do ingles, *TAR RNA-Binding Protein*  
Tyk2 – Tirosina quinase 2  
UTR – do inglês - *Untraslated Region*  
WB – do inglês – *Western Blotting*  
WNV – do inglês - *West Nilo Virus*  
WT – do inglês - *Wild Type*  
YFV – do inglês - *Yellow Fever Virus*  
ZIKV – Zika vírus  
ZIKV<sup>BR</sup> – Zika vírus cepa brasileira  
ZSV – Zona Subventricular  
ZV – Zona Ventricular  
µg – microgramas  
µL – microlitros  
µM - micromolar

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1. Zika vírus

O Zika vírus (ZIKV) foi primeiramente isolado do sangue de macacos *Rhesus sp.* sentinelas e de um *pool* de mosquitos *Aedes africanus* em 1947 na floresta *Ziika* em Uganda, África. A primeira evidência que o ZIKV era um novo patógeno ocorreu em 1952, quando injetaram sangue de macacos *Rhesus sp.* no cérebro de camundongos swiss, e os mesmos apresentaram sintomas por até 10 dias<sup>1</sup>. Em 1969, o ZIKV foi também isolado de outras espécies de mosquitos, como o *Aedes albopictus*, e o mais importante, *Aedes aegypti*<sup>2,3</sup>. Anteriormente, o vírus era negligenciado pelos cientistas, uma vez que causava raras infecções em humanos na África e Ásia<sup>4</sup>. Porém, em 2007, na Ilha de Yap na Micronésia, um grande número de pessoas apresentou sintomas como, febre moderada (37,8 - 39,5 °C), dores de cabeça, artralgia das mãos e pés, conjuntivite e erupções cutâneas maculopapular, também conhecidas como *rash*. Inicialmente, esses pacientes foram diagnosticados com Dengue vírus (DENV), porém posteriormente, descobriu-se que se tratava de um surto do ZIKV<sup>5</sup>.

Mais tarde, foram identificados surtos em outros países, como na Polinésia Francesa em 2014<sup>6</sup>, no Tahiti<sup>7</sup> em 2013, e na Nova Caledônia em 2014<sup>8</sup>. A partir do primeiro semestre de 2015 uma epidemia generalizada de ZIKV irrompeu na América do Sul e Central, sendo o nordeste do Brasil a região mais afetada. Mais importante, clínicos notaram um aumento significativo no número de casos com complicações neurológicas graves, incluindo a Síndrome de Guillain-Barré e de bebês nascidos com microcefalia. Hoje sabemos que a microcefalia é na verdade apenas um dos sinais que caracterizam a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ). Apesar de ser inquestionavelmente o sinal mais dramático, sabemos que bebês nascidos de mães infectadas durante a gestação podem nascer com microcefalia associada ou não a outros sinais, como artrogripose, restrição de crescimento intrauterino (IUGR), uveíte e degeneração de retina<sup>9-12</sup>. Em 2016, 216.207 casos foram registrados durante a grande epidemia de ZIKV. Em 2017, 17.594 foram os casos prováveis de infecção. Nesse mesmo ano, o Brasil apresentou cerca de 13.490 casos notificados e 2.653 casos confirmados de microcefalia causada pelo ZIKV, e o epicentro da epidemia foi no nordeste brasileiro, sendo os estados da Bahia (433 casos), Pernambuco (408 casos) e Paraíba (191 casos) os mais afetados<sup>13</sup>. No primeiro semestre de 2018 foram registrados 330 casos prováveis de febre pelo ZIKV no país, sendo 48

destes confirmados<sup>14</sup>. Em 2019, 161 grávidas do estado de Pernambuco apresentaram sintomas semelhantes aos da infecção pelo ZIKV<sup>13</sup>. Entre 2020 e 2021, foram registrados 544 casos de microcefalia grave. No primeiro semestre de 2022, foram confirmados 323 casos de infecção pelo ZIKV, mas nenhum caso de microcefalia<sup>13</sup>. Embora atualmente os casos de microcefalia causada por ZIKV estejam reduzidos, o vírus ainda está circulando e as consequências para cada bebê são drásticas. Portanto, compreender seus mecanismos ainda é fundamental para estarmos preparados para futuros surtos, bem como para o desenvolvimento de vacinas ou intervenções terapêuticas.

O ZIKV é um arbovírus da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus*, de estrutura simétrica, nucleocapsídeo icosaédrico envelopado, com RNA fita simples e polaridade positiva, e que codificam três proteínas estruturais: Cápsula (C), Pré-membrana (Pr-M) e Envelope (Env), e sete proteínas não estruturais: NS1, NS2a-2b, NS3, NS4a-4b e NS5<sup>1</sup>.

A glicoproteína NS1 possui uma superfície hidrofóbica alongada que se associa à membrana celular e uma superfície polar que varia entre os flavivírus. Assim, a glicoproteína NS1 se associa a lipídeos formando um homodímero dentro das células, os quais são necessários para infecção e replicação viral<sup>15</sup>. Sabe-se que a NS1 do DENV, outro vírus da família *Flaviviridae*, e que apresenta semelhanças estruturais ao ZIKV, é secretada como lipoproteína hexamérica podendo interagir com componentes do sistema imune inato e adaptativo, sendo inclusive, capaz de evadir da resposta imune<sup>16</sup>. Foi reportado em 2012 que a linhagem asiática do ZIKV fixou uma mutação na NS1 que aumentou a infectividade em mosquitos *Aedes aegypti* e tornou possível sua ligação ao TBK1 que, conseqüentemente é menos fosforilado, levando à inibição da indução de interferon- $\beta$ <sup>17,18</sup>.

A NS2A participa do processo de montagem da membrana durante a liberação de partículas infecciosas<sup>19</sup>. Recentemente foi descrita sua participação durante a lesão provocada pelo ZIKV, uma vez que a introdução de proteínas individuais codificadas pelo ZIKV no córtex embrionário de camundongos causou redução da proliferação e diferenciação de células da glia e neurônios por degradar proteínas de junções aderentes<sup>20</sup>.

A interação entre NS2B e NS3 já era conhecida em outros flavivírus há muitos anos<sup>21,22</sup>, mas pouco se sabe sobre ela no ZIKV. Alguns trabalhos descrevem um papel importante no processamento de proteínas virais e durante a replicação, tornando-se um alvo atrativo para o desenvolvimento de drogas antivirais<sup>23</sup>.

A NS4A têm sido descrita por auxiliar a replicação viral, enquanto que, a NS4B tem papel fundamental na inibição de componentes do sistema imune<sup>24,25</sup>. Além disso, essas duas proteínas estruturais agem em conjunto para desregular a sinalização Akt-mTOR em células tronco neuronais, inibindo a neurogênese e induzindo a autofagia<sup>26</sup>.

A NS5 do ZIKV e de outros flavivírus é capaz de suprimir a sinalização de IFN-tipo I, embora por diferentes mecanismos. A NS5 do DENV é capaz degradar via proteassoma o fator de transcrição STAT2 de humanos, essencial para geração de genes estimulados por interferon (ISG – *Interferon Stimulated Genes*) e consequente ativação do estado antiviral, porém esse mecanismo para ZIKV ainda não está muito bem estabelecido<sup>27</sup>. Durante a infecção pelo ZIKV, sua NS5 se localiza no núcleo da célula, participando da inibição de IRF3, STAT2 e consequentemente da produção de IFN do tipo I<sup>28</sup>. Embora tenhamos conhecimento sobre algumas funções, ainda há muito a ser elucidado acerca das funções biológicas dessas proteínas durante a invasão celular, replicação viral, evasão da resposta imune e, ainda mais, na patogenicidade do ZIKV.

## 1.2. ZIKV e alterações neurológicas

Uma das primeiras evidências da relação causal entre o ZIKV e a microcefalia foi reportada em março de 2016. Uma cidadã europeia que trabalhava como voluntária em Natal – RN engravidou em fevereiro de 2015. Na 13<sup>ª</sup> semana de gestação apresentou sinais e sintomas como febre alta, dor osteomuscular e retrocular. Com isso, foi realizado o acompanhamento médico durante a gestação sendo que na 32<sup>ª</sup> semana o feto apresentou IUGR, inúmeras calcificações corticais e subcorticais, ventriculomegalia moderada e perímetro encefálico de 26 cm, indicativo de microcefalia (controle  $\leq 32 \text{ cm} \pm \text{SD}$ ). As análises *post-mortem* mostraram a presença do ZIKV no cérebro fetal por qPCR e ausência de outros flavivírus como, DENV, Vírus da Febre Amarela (YFV – *Yellow Fever Virus*) e Vírus do Oeste do Nilo (WNV – *West Nile Virus*). As análises anatomopatológicas demonstraram a paquigiria, lisencefalia, ventrículo esquerdo colapsado e ventrículo direito dilatado. Além disso, a análise histológica e celular mostrou astrogliose no espaço subaracnóideo, com presença de partículas virais no citoplasma de neurônios<sup>29</sup>. Trabalhos posteriores, de fato, corroboraram tais achados e, além disso, demonstraram a presença do vírus no fluido amniótico<sup>30</sup>, placenta<sup>31</sup>, líquido<sup>29</sup> e retinas<sup>32</sup> dos bebês com microcefalia. Todas essas informações



aumentaram as suspeitas acerca da relação causal entre o ZIKV e a microcefalia, a qual ainda precisava ser de fato comprovada.

A relação causal entre o ZIKV e a microcefalia foi comprovada em três trabalhos publicados em modelos experimentais utilizando camundongos susceptíveis à infecção<sup>33-35</sup>. O primeiro utilizou o ZIKV isolado da Polinésia Francesa em duas abordagens experimentais distintas: 1) camundongos fêmeas IFNAR1<sup>-/-</sup> e 2) camundongos fêmeas WT tratadas com anticorpos bloqueadores do receptor IFNAR1 (clone MAR1-5A3). Isso porque sabidamente os IFNs tipo I conferem resistência à infecção por flavivírus. Os resultados demonstraram que as fêmeas infectadas por via subcutânea com 10<sup>3</sup> FFU em E6.5 e E7.5 e analisados no E13.5 e E15.5 apresentaram além de abortamentos, filhotes com IUGR, palidez, presença de tecido necrótico na placenta e na cabeça dos fetos. Porém, não foi observada microcefalia. qPCR para o ZIKV foi positivo na placenta e cérebro dos fetos. No segundo modelo, cujas fêmeas foram tratadas com anti-IFNAR-1 em E5.5, infectadas em E6.5 e E7.5 e avaliadas em E13.5 e E15.5, observou-se também IUGR associado à presença do vírus nos tecidos fetais<sup>33</sup>.

Outro grupo realizou a injeção do ZIKV via intracerebroventricular nos fetos de camundongo C57BL/6 WT em E13.5. As análises realizadas no E16.5 demonstraram que as áreas infectadas eram a zona ventricular (ZV) e subventricular (ZSV) onde se encontram a maior parte das células precursoras neuronais (NPCs). Além disso, houve uma redução de NPCs TBR1<sup>+</sup>, SOX2<sup>+</sup> e FOXP2<sup>+</sup>, marcadores desta população celular, evidenciadas por imunofluorescência. Tais achados se associavam à redução da espessura da placa cortical (CP – *cortical plate*), da ZV e ZSV do cérebro, resultando na redução do tamanho do cérebro<sup>34</sup>.

No trabalho publicado pelo nosso grupo, demonstramos que neonatos nascidos de fêmeas de camundongos SJL infectados com 10<sup>12</sup> PFU por via intravenosa entre os dias E10-E12 apresentam IUGR caracterizada pela diminuição do peso e tamanho (CRL – *Crown-rump length*). Além disso, os animais desenvolveram microcefalia, com menor distância biparietal, e comprimento total e altura craniana, associado a um comprometimento do desenvolvimento ocular. A análise histológica mostrou a diminuição do córtex cerebral, com vacuolização nuclear, marginalização da cromatina em neurônios do córtex, tálamo e hipotálamo, o que não foi observado no cerebelo e no hipocampo<sup>35</sup>.

Vale ressaltar que os outros trabalhos utilizaram animais IFNAR1<sup>-/-</sup> ou bloqueadores de IFNAR<sup>33</sup>, além da injeção intracerebroventricular nos filhotes durante a gestação<sup>34</sup>. Sendo assim, nossos resultados demonstraram claramente que o vírus é capaz de ser transmitido

verticalmente, ultrapassando a placenta e alcançando o sistema nervoso central (SNC) dos fetos, repercutindo na destruição de populações celulares importantes. De fato, observamos que o mesmo foi capaz de infectar as NPCs e neurônios, tanto *in vitro* quanto *in vivo*, induzindo morte celular por autofagia e apoptose, evidenciadas pela análise de expressão de caspase-3 ativa, além do perfil de expressão de 96 genes relacionados a esses fenômenos, que nos mostrou que o ZIKV regula positivamente genes como *Bmf*, *Irgm1*, *Bcl2*, *Htt*, *Casp6* e *Abl1*, e negativamente *Gadd45a*, *Tnfrsf11b*, *Fasl*, *Atg12*, *Bcl2l11* e *Dffa* no cérebro de neonatos SJL nascidos de mães infectadas por ZIKV em comparação com os neonatos nascidos de mães não infectadas<sup>35</sup>. Além disso, observou-se a redução da camada cortical pela morte de NPCs TUJ<sup>+</sup>, SOX-2<sup>+</sup> e TBR-1<sup>+</sup>, evidenciado pelos estudos *in vitro* utilizando organoides cerebrais ou *mini-brains*, também corroborado por outros grupos, inclusive do Brasil<sup>35-37</sup>.

Em seguida, diversos modelos foram utilizados visando compreender a SCZ, e outras alterações neurológicas foram descritas, como a perda de neurônios alfa motores na medula espinhal e malformação cerebelar, o que pode levar a paralisia<sup>38</sup>. Estudos utilizando macacos ratificaram ainda mais os danos neurológicos que o ZIKV pode desenvolver. Macacos *Rhesus* e cinomolgos adultos se apresentaram susceptíveis à infecção, uma vez que o RNA viral foi encontrado no plasma, saliva, líquido cefalorraquidiano (CSF – *cerebrospinal fluid*), cérebro, tecidos reprodutivos femininos e masculinos, sêmen e de maneira transiente em secreções vaginais<sup>39</sup>. Também foi demonstrado que *Rhesus* não gestantes e gestantes permanecem virêmicos por 21 ou até por 57 dias após infecção<sup>40</sup>, e que o vírus é persistente no SNC e nos linfonodos por uma regulação positiva de mTOR, das vias de sinalização pró-inflamatória e anti-apoptótica, bem como da regulação negativa das vias de sinalização da matriz extracelular<sup>41</sup>.

Quanto aos estudos relacionados com transmissão vertical, foi observado que a infecção intravenosa ou intra-amniótica no segundo trimestre da gestação de macacos levou à altos níveis de vírus nos tecidos placentários e fetais, especialmente no cérebro, que exibiu calcificações e reduziu as NPCs<sup>42</sup>. Os macacos infectados no início da gestação exibiram neuropatias mais complexas como, microcalcificações cerebrais, hemorragia, necrose, vasculite, gliose e apoptose de NPCs e, pelas análises de ressonância magnética observaram-se lesões concordantes indicativas de lesão na substância cinzenta profunda<sup>43</sup>. Além disso, foi verificado um transporte anormal de oxigênio na placenta em consequência da vasculite uterina e do dano viloso placentário causado pelo ZIKV<sup>44</sup>.

Recentemente estudiosos têm se atentado em observar alterações neurológicas provocadas pelo ZIKV em neonatos infectados pós-natalmente. Estudos realizados com camundongos ratificou o tropismo cerebral, causando microcefalia pós-natal e vários déficits de comportamento na vida adulta. Durante a fase aguda, os camundongos desenvolveram convulsões frequentes, e durante a idade adulta houve persistência da replicação viral, neurodegeneração e calcificações cerebrais<sup>45</sup>. Em macacos *Rhesus*, alterações semelhantes foram observadas, como, anomalias histopatológicas no sistema nervoso periférico e central, incluindo infiltrados inflamatórios, astrogliose e degeneração de áreas cerebrais envolvidas em comportamento emocional<sup>46</sup>. Isso nos mostra que a infecção neonatal por ZIKV tem complicações neuropatológicas e comportamentais tão relevantes quanto à infecção vertical.

Os resultados demonstram claramente que o vírus possui um tropismo pelo SNC dos fetos, repercutindo na destruição de populações celulares importantes, como os neurônios. Porém, vale ressaltar a importância das células da glia durante a infecção, uma vez que são células muito prejudicadas, auxiliando no desenvolvimento das más formações observadas.

Dentre as diferentes populações celulares que formam a glia, uma das mais abundantes é a população de astrócitos. Essas células são responsáveis por inúmeras funções essenciais para o funcionamento do cérebro, incluindo o metabolismo de substratos energéticos para os neurônios, produção de metabólitos essenciais para o neurodesenvolvimento, manutenção da homeostase do pH, reparo tecidual, e regulação da atividade sináptica<sup>47</sup>. Embora pouco se saiba sobre o papel de células da glia infectadas no desenvolvimento da microcefalia causada pelo ZIKV, foi evidenciado que astrócitos são as primeiras células a serem infectadas pelo vírus devido sua localização perivascular, podendo ter papel fundamental na neuropatogênese da microcefalia<sup>48,49</sup>.

Astrócitos reativos foram identificados em fetos com 32 semanas de gestação nas regiões cerebrais afetadas pelo vírus<sup>29</sup>. O funcionamento prejudicado de astrócitos pode contribuir significativamente durante desenvolvimento de microcefalia por afetar o crescimento do córtex devido ao prejuízo na neurogênese e gangliogênese<sup>50,51</sup>. Os astrócitos infectados por ZIKV apresentam desregulação na tradução de proteínas, no metabolismo de glicose, no controle sináptico e também na migração e diferenciação celular<sup>52</sup>. Além disso, foi demonstrado que os astrócitos são mais susceptíveis à infecção pelo ZIKV do que os neurônios, uma vez que toleravam maiores cargas virais, sofrem menos apoptose e, conseqüentemente, são utilizados para maior replicação viral<sup>53</sup>.

### 1.3. Suscetibilidade e resistência ao ZIKV

Embora as alterações neurológicas provocadas pelo ZIKV causem danos irreversíveis em fetos e neonatos infectados, é sabido que apenas 6 a 12% do das gestantes infectadas geram crianças que desenvolvem SCZ<sup>54,55</sup>.

De forma interessante, em nosso trabalho, quando realizamos a infecção em animais C57BL/6 WT gestantes, observamos que os mesmos foram completamente resistentes à infecção<sup>35</sup>. Isso mostra que as diferenças genéticas influenciam na susceptibilidade de grávidas ao ZIKV e à microcefalia. Estas alterações podem estar relacionadas à múltiplos fatores, sendo provável que aqueles relacionados à resposta imune, como os Interferons Tipo I (IFN tipo I), assim como aqueles relacionados aos receptores de invasão viral, sejam os mais relevantes<sup>56,57</sup>.

Os IFNs tipo I, IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , são as principais citocinas envolvidas na resposta imune antiviral e são provenientes da ativação dos fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7<sup>58</sup>. Os IFN tipo I interagem com o receptor de IFN (IFNAR1 e IFNAR2) desencadeando a ativação de JAK1, tirosina quinase 2 (Tyk2) e a ativação dos fatores de transcrição STAT1 e STAT2, resultando na transcrição dos genes estimulados por interferon (ISGs – *interferon stimulated genes*)<sup>59</sup>. Estes impedem a replicação viral por uma série de mecanismos, os quais variam desde a produção de citocinas e fatores líticos, até a indução de apoptose e autofagia, sendo assim, muito importantes na monta da resposta imune<sup>60</sup>. Como dito anteriormente, a NS5 do ZIKV é capaz de induzir a degradação de STAT2, diminuindo a produção de ISGs e estimulando a replicação viral<sup>27</sup>.

Os receptores de invasão viral, como os receptores de membrana da família TAM, fazem parte da família de receptores tirosina quinase, cujos principais membros são *Tyro-3*, *Axl* e *Mertk*. Os mesmos têm recebido grande relevância no contexto de infecções virais, uma vez que são essenciais na invasão celular, como demonstrado nas infecções pelos vírus da DENV<sup>61</sup>, Ebola<sup>62</sup> e o ZIKV<sup>63</sup>. Esses receptores interagem com moléculas de fosfatidilserina presentes na membrana de células em apoptose, assim como no envelope dos vírus citados acima, através de um mecanismo chamado mimetismo apoptótico. Tal interação pode ocorrer diretamente, ou através de mediadores solúveis intermediários, como Gas6 e Proteína S<sup>64,65</sup>. Essa interação promove não só a internalização das partículas virais, mas também o disparo de importantes vias de sinalização, as quais podem variar de acordo com outros receptores associados, como na presença de receptores de citocinas<sup>66</sup>. Recentemente foi demonstrado

pelo nosso grupo, que as complicações neurológicas causadas pelo ZIKV estão associadas com os altos níveis de Gas6, um ligante solúvel de receptores TAM, o qual facilita a invasão e replicação viral<sup>67</sup>.

Além disso, os receptores TAM podem se associar com receptores de citocinas, como por exemplo, com o IFNARI, estimulando a ativação de SOCS-1/3, bloqueando a sinalização dos IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ , suprimindo a resposta imune local e favorecendo a replicação viral<sup>66</sup>. É plausível pensarmos que esse seja um mecanismo de evasão da resposta imune local, a despeito de que os mecanismos ainda não sejam completamente compreendidos.

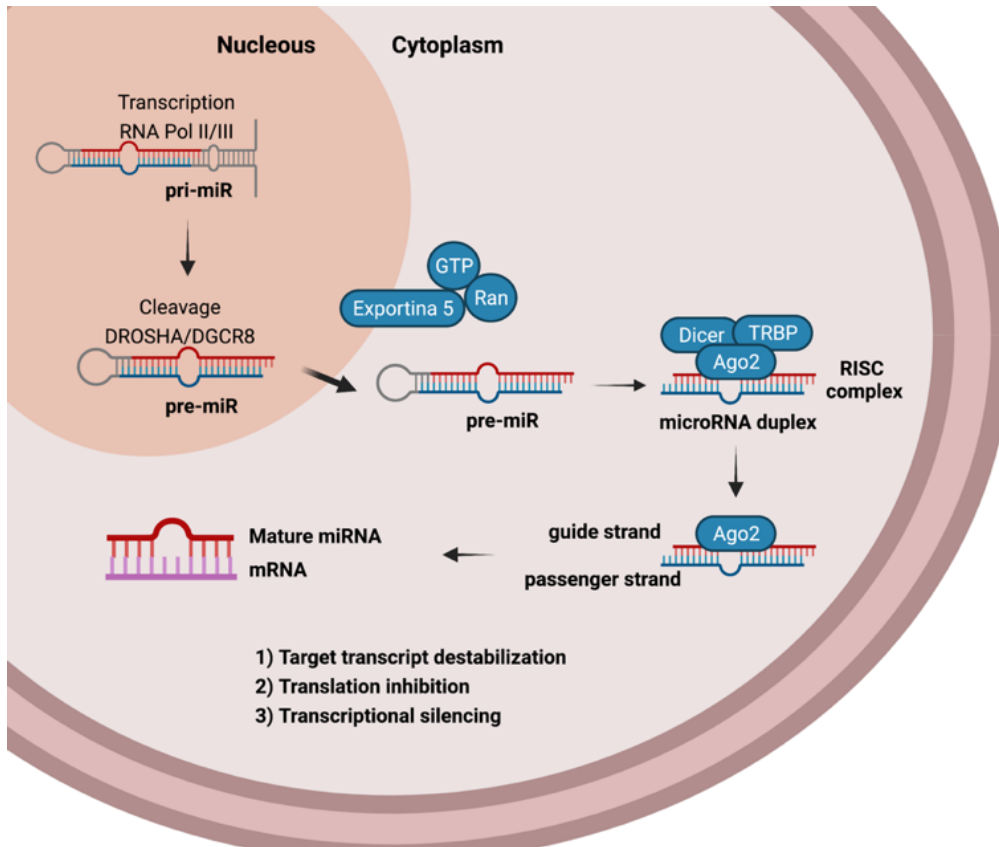
Neste contexto, alguns resultados têm também demonstrado que os miRNAs podem bloquear a sinalização de IFN tipo I, como por exemplo, o miR-BART16 que é capaz de regular negativamente a proteína CREB, um co-ativador da sinalização de IFN tipo I e, conseqüentemente, suprimir esta sinalização levando a uma produção deficiente de ISGs e bloqueando os efeitos que inibem o Vírus Epstein-Barr (EBV) em células de linfoma de Burkitt infectadas *in vitro*<sup>68</sup>.

#### 1.4. microRNAs

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA de fita simples não codificantes e regulatórios que fazem o controle pós-transcricional da expressão gênica por se ligarem nas regiões 3' não traduzidas dos mRNAs (UTR – *Untranslated Region*) desestabilizando-os e bloqueando a tradução das proteínas que codificam<sup>69-72</sup>. É sabido que mais de 60% dos genes humanos que codificam proteínas possuem pelo menos um sítio de ligação de miRNA conservado, e que existem muitos sítios não conservados, sendo assim, a maioria dos genes podem ser regulados pela ação dos miRNAs. Portanto, é importante que os miRNAs sejam bem controlados, uma vez que sua desregulação é associada com doenças, inclusive associadas ao desenvolvimento neurológico<sup>73,74</sup>. O primeiro miRNA descoberto foi o Lin-4 em 1993, identificado em *C. elegans* (*Caenorhabditis elegans*), e sua expressão é essencial para o desenvolvimento pós embrionário deste nematódeo, uma vez que o Lin-4 diminui a expressão da proteína LIN-14, um evento fundamental para o primeiro estágio larval (L1)<sup>75</sup>.

Os miRNAs são codificados a partir de regiões intrônica, intergênicas ou na fita antisense do genoma. Estes são transcritos pelas RNAs polimerases II e III e processados a partir de longas cadeias primárias (pri-miR), as quais podem conter um ou vários miRNAs<sup>76,77</sup>. Os pri-miR possuem forma de grampo, sendo caracterizados por um eixo de RNA de dupla fita

(dsRNA) com alguns nucleotídeos não pareados, uma 7-metilguanósina (CAP) no 5' terminal e com cauda poli A na extremidade 3', podendo ter mais de mil nucleotídeos<sup>69</sup>. Esses são processados no núcleo pela endorribonuclease (RNase II - *Drosha*) que apresenta em seu terminal carboxila domínios RIIIDs que são responsáveis pelos cortes das extremidades 3' e 5', e um domínio dsRBD, que se liga ao dsRNA. Além disso, a proteína ligadora de RNA denominada DGRC8 (*DiGeorge Syndrome Critical Region Gene*) é um cofator responsável pelo suporte da atividade de ligação ao dsRNA. Juntas, DGCR8 e DROSHA são responsáveis por gerar o pre-miR (miRNA precursor) mais curto com aproximadamente 65 nucleotídeos e estrutura em alça<sup>78,79</sup>. O pre-miR pode ser transferido para o citosol pelo complexo formado pela proteína exportina 5 e a proteína nuclear RNA de ligação a GTP (RAN-GTP)<sup>80,81</sup>. Após a translocação, o GTP é hidrolisado, resultando na liberação do pre-miR<sup>82</sup>. No citosol, o pre-miR é processado pela RNase III (*Dicer*) e por um cofator ligante de RNA denominado TRBP (*TAR RNA-Binding Protein*) em um miRNA curto de filamento duplo com cerca de 20 e 24 pares de base, conhecido como duplex de miRNA<sup>83</sup>. A proteína TRBP com o auxílio da RNA helicase DHX9<sup>84</sup>, recruta Dicer contendo o duplex de miRNA e a AGO 2 (*Argonaute*) formando o complexo silenciador induzido por RNA (miRISC - *miRNA-Containing RNA-Induced Silencing Complex*)<sup>85</sup>. Em seguida, o duplex de miRNA é transferido da Dicer para AGO2, onde a fita do duplex com menor estabilidade na região 5' gera o miRNA maduro (fita guia), enquanto a outra fita (passageira) é descartada e rapidamente degradada<sup>83,86,87</sup>. Dessa forma, o miRNA maduro de fita simples pode se emparelhar a várias sequências complementares de diversos mRNAs, e uma vez que se emparelham participam, principalmente, da regulação negativa dos mesmos, interferindo na produção de proteínas que codificam<sup>88</sup> (**Figura 1**).



**Figura 1. Visão geral da biogênese de miRNAs.** A biogênese consiste na transcrição do gene do miRNA e maturação que envolve as etapas: 1) Processamento do pri-miRNA pela DROSHA; 2) Processamento do pre-miRNA pela DICER; 3) Outras modificações até a obtenção do miRNA maduro e formação do complexo RISC. Posteriormente, o miRNA maduro é capaz de regular o mRNA e consequentemente, interferir na produção de proteínas<sup>89</sup>. Figura criada no BioRender.com<sup>90</sup>.

Os mecanismos de regulação dos miRNAs são divididos em: i) desestabilização do transcrito alvo, ii) inibição da tradução e iii) silenciamento transcricional. A desestabilização é representada pela **a)** clivagem do mRNA-alvo, o qual a fita de miRNA guia leva a AGO até o mRNA para realizar o corte no sítio alvo<sup>91,92</sup>; e pela **b)** deadenilação seguida de remoção do 5' CAP do mRNA, uma vez que AGO se associa a GW182, que recruta o complexo CCR4-NOT, que promove a remoção da cauda poli-A, levando a desestabilização do mRNA e consequente degradação do mesmo por exorribonucleases<sup>93</sup>. Já a inibição da tradução é representada por **a)** competição pelo 5' CAP, uma vez que os miRNA levam a AGO até o mRNA, que por sua vez compete pelo 5' CAP, impedindo a associação dos mRNA com ribossomos<sup>94,95</sup>; pelo **b)** bloqueio da iniciação da tradução, impedindo que a cauda poli-A interaja com a proteína PABPC1 (do inglês - *poly-A binding protein C1*) e que o 5' CAP interaja com eIF4E/eIF4G (do inglês - *Eukaryotic Translation Initiation Factor 4E/4G*)<sup>96,97</sup>; e **c)** dissociação dos ribossomos, no qual alguns miRNAs levam a desmontagem antecipada dos ribossomos<sup>98</sup>. Além disso, os miRNAs

podem realizar o silenciamento transcricional que envolve os corpúsculos de processamento de RNA (*p-bodies*) que são agregados ribonucleoproteicos citoplasmáticos<sup>99</sup>. Os miRNAs direcionam os mRNA-alvo para os *p-bodies*, onde são temporariamente e reversivelmente reprimidos ou desestabilizados<sup>100</sup>.

Há a expressão de miRNAs em diversos tipos de células e tecidos, o que os tornam biomarcadores para detecção e progressão de doenças, bem como alvos para intervenção terapêutica. Além disso, alguns miRNAs podem participar da regulação de processos celulares, como na apoptose, e alguns vírus produzem ou podem induzir a produção de miRNAs que possuem papel fundamental em seu ciclo replicativo, favorecendo a infecção<sup>101</sup>.

Existem muitos trabalhos ressaltando a importância de alguns *miRNAs* na infecção por flavivírus, demonstrando que esses podem atuar aumentando a expressão de *miRNAs* que inibam a resposta imune<sup>102</sup>. Por exemplo, o vírus da encefalite japonesa (JEV – *Japanese Encephalitis Virus*), que infecta neurônios e células da microglia causando dano neuronal e inflamação, é capaz de modular a expressão de miRNAs, que por sua vez modulam genes responsáveis pela resposta imune celular e diminuem a expressão de genes antivirais. A infecção por JEV eleva a expressão de miR-146 que regula negativamente os genes TRAF6, IRAK1, IRAK2 e STAT1. Além disso, o miR-146a suprime a ativação de NF- $\kappa$ B e a via Jak-STAT, resultando na regulação negativa dos ISGs (IFIT-1 e IFIT-2) e facilitando a replicação viral<sup>102</sup>.

Por outro lado, a regulação positiva da expressão de alguns miRNAs pode ser benéfica durante a infecção por alguns flavivírus, levando à diminuição da replicação viral. Isso é corroborado pelo fato de que a superexpressão do miR-155 em células CHME3, uma linhagem de células da microglia, resulta na redução significativa da replicação de JEV<sup>103</sup>.

Alguns trabalhos recentes demonstram a correlação do ZIKV com os miRNAs. Um grupo brasileiro, utilizando neuroesferas humanas, mostrou que o ZIKV se replica à custa da parada da proliferação e diferenciação de células neuronais. Ademais, o ZIKV regula positivamente uma rede de alvos relacionados com a replicação viral e regula negativamente moléculas associadas com ciclo celular e diferenciação neuronal. Ainda nesse trabalho, demonstrou-se que a infecção por ZIKV modula vias envolvidas no processamento de RNA (DDX6, PCBP2), na biogênese de *miRNAs* (DGCR8, XPO1), na regulação da iniciação de tradução (eIF3c) e em proteínas, tais como, fatores de *splicing* (SFPO, PRP8), proteínas ribossomais (RPS6KA5, RPL28), proteínas relacionadas com a resposta imune inata (TLR4) e com o desenvolvimento neuronal (NEUROD1, SATB2)<sup>104</sup>.



Sabe-se também que existem genes relacionados à microcefalia autossômica recessiva (MCPH - *Microcephaly Primary Hereditary*). São 12 MCPH nos loci (MCPH1-MCPH12) que foram mapeados e contêm os seguintes genes: *Microcephalin*, *WDR62*; *CDK5RAP2*; *CASC5*; *ASPM*; *CENPJ*; *STIL*; *CEP135*; *CEP152*; *ZNF335*; *PHC1* e *CDK6*. Acredita-se que a modulação desses genes pode levar ao fenótipo da doença devido a uma condensação cromossômica prematura, DNA danificado, dinâmica dos microtúbulos perturbados, controle transcricional e mecanismos centrosomáticos ocultos que regulam o número de neurônios produzidos por células precursoras neuronais<sup>105</sup>. Recentemente através de uma análise computacional hipotetizou-se que o ZIKV leva a transcrição de seis miRNAs do hospedeiro que regulam vias genéticas neuronais que compartilham homologias mútuas significativas com os 12 genes de MCPH<sup>105</sup>, sugerindo que o ZIKV pode modular genes relacionados com a microcefalia.

Embora o ministério da saúde tenha declarado o fim da emergência em saúde pública de importância nacional (Espin) em decorrência do ZIKV em 11 de maio de 2017, as alterações neurológicas provocadas pelo ZIKV causam consequências graves para os fetos nascidos de mães infectadas ou neonatos infectados, tornando-as dependentes e dificultando seu desenvolvimento e inserção na sociedade.

Neste contexto, os miRNAs são importantes em diferentes cenários, podendo afetar o neurodesenvolvimento, a resposta imune antiviral e vias de morte celular. Sendo assim, pesquisas mais aprofundadas e que envolvam todas as áreas de estudo precisam ser realizadas. Nosso objetivo foi estudar o papel dos miRNAs na susceptibilidade e resistência à neuropatogênese da infecção pelo ZIKV, com foco nos astrócitos, tentando desvendar possíveis mRNAs alvos, correlacionando-os com o estabelecimento da microcefalia e das lesões cerebrais. Tal estudo nos fornece dados de extrema importância não só acerca da desconhecida infecção pelo ZIKV, mas também na elucidação dos mecanismos de lesão no SNC de bebês com microcefalia, os quais poderão alicerçar, principalmente, futuros estudos terapêuticos e quem sabe auxiliar na erradicação das infecções provocadas pelo ZIKV.

## 2. OBJETIVOS

### 2.1. Objetivos gerais

Caracterizar o perfil de miRNAs, suas interações com mRNAs alvos e seu papel na imunopatogênese da microcefalia causada pelo ZIKV em modelos experimentais.

### 2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil de miRNAs no cérebro de neonatos nascidos de mães não infectadas ou infectadas pelo ZIKV por PCR array;
- Avaliar o perfil de miRNAs em astrócitos primários de neonatos de SJL infectados ou não pelo ZIKV por PCR array;
- Realizar por análise computacional a predição de mRNAs alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV no cérebro dos neonatos e em astrócitos primários, focando em genes relacionados com morte celular, neurodesenvolvimento e resposta imune antiviral.
- Relacionar os mRNA modulados no transcriptoma (*RNA-sequencing*) do cérebro dos neonatos com os miRNAs regulados pelo ZIKV por análise computacional.
- Confirmar a interação miRNA-mRNA utilizando qPCR, miRNAs mímicos, inibidores e ensaio de luciferase.
- Entender como os miRNAs são regulados pela infecção do ZIKV por Imunoprecipitação de cromatina (ChIP), Western Blot (WB) e silenciamento de RNA (siRNA), avaliando as vias envolvidas.
- Avaliar o perfil transcricional de astrócitos isolados por *cell sorting* do cérebro de neonatos nascidos de SJL infectadas ou não com ZIKV, correlacionando com os achados *in vitro*, por qPCR.
- Avaliar o perfil transcricional de astrócitos provenientes de animais C57BL/6 WT por qPCR e comparar com os achados dos animais SJL suscetíveis, tentando compreender mecanismos de resistência e susceptibilidade ao desenvolvimento da SCZ.

### 3. MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1. Animais

Foram utilizados camundongos fêmeas da linhagem SJL selvagens (JAX), de 6-8 semanas de idade para os experimentos de transmissão vertical. Também foram utilizados animais SJL e C57BL/6 WT até 3 dias de vida para realização da cultura primária de astrócitos murinos. Os mesmos foram mantidos no Biotério do Departamento de Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (ICB-USP) em estantes ventiladas sob condições controladas de temperatura, umidade e iluminação (ciclo claro/escuro de 12 horas). Todos os protocolos foram submetidos à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa Animal desta mesma instituição, protocolo nº 87/2017 aprovado 08/08/2017 (**Anexo 1**).

#### 3.2. Cultivo e amplificação viral

Um isolado de ZIKV liofilizado de um caso clínico no Brasil (ZIKV<sup>BR</sup>) (BeH823339), fornecido pelo Instituto Evandro Chagas em Belém, Pará, foi reconstituído em 0,5 mL de água estéril de DEPC. As células de mosquito de *Aedes albopictus* (células C6/36) foram previamente preparadas para cultura do vírus, e mantidas em meio L-15 suplementado (Sigma-Aldrich, L1518) com 10% de soro bovino fetal (SBF – Gibco, 12657-029), 1% de aminoácidos não essenciais (LGC, BR30238-01), 1% de piruvato de sódio (LGC, BR30239-01), 1% de Penicilina/Estreptomicina (Gibco, 15140-122), 0,05% de anfotericina B (Gibco, 15290026) à 27 °C, na ausência de CO<sub>2</sub>. Primeiramente, produzimos a primeira subcultura (T1). Para tanto, inoculamos 50 µL da amostra viral diluída em 950 µL de meio L-15 incompleto nas células C6/36 semeadas em garrafas de 25 cm<sup>2</sup> com aproximadamente 70% de confluência, durante uma hora para adsorção, com agitação suave a cada 10 min para permitir a adsorção homogênea dos vírus. No final do período de adsorção, adicionamos 5 mL do meio de cultura L-15 suplementado com 2% de SBF, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de piruvato de sódio. Após quatro dias, o sobrenadante foi recolhido. A segunda subcultura (T2) foi feita às cegas, transferindo 500 µL do sobrenadante T1 diluído em 4,5 mL de meio L-15 incompleto para células C6/36 em frascos de 182 cm<sup>2</sup> durante uma hora para adsorção. No final da adsorção foi adicionado 20 mL de meio L-15 suplementado e incubado por mais quatro dias, e o sobrenadante foi coletado. A terceira subcultura (T3), foi realizada transferindo 500 µL do sobrenadante T2 diluído em 4,5 mL de meio L-15 incompleto para células C6/36 em frascos de 182 cm<sup>2</sup> durante uma hora para adsorção. No final da adsorção foi adicionado 20 mL de

meio L-15 suplementado e incubado por oito dias, quando as células apresentavam alterações morfológicas e o sobrenadante foi coletado. Os estoques virais T1, T2 e T3 foram produzidos pelo Prof. Edson Durigon (Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo). A partir de T3, realizamos os nossos estoques virais inoculando 500 µL de vírus T3 diluído em 4,5 mL de meio L-15 incompleto em células C6/36 semeadas em frascos de 182 cm<sup>2</sup> durante uma hora para adsorção. No final da adsorção foi adicionado 20 mL de meio L-15 suplementado. As células foram incubadas por 4-8 dias até atingirem 70% de efeito citopático. Os sobrenadantes foram coletados, centrifugados por 5 min a 10.000 g, 4°C, concentrados usando 5× Polietilenoglicol (PEG, Sigma-Aldrich, MAK343), titulados, aliquotados e congelados a -80°C até o uso.

### 3.3. Titulação viral em PFU

A titulação (em PFU ml<sup>-1</sup>, do inglês - *Plate forming unit*) de cada subcultura e das amostras de sobrenadante de astrócitos foi obtida por ensaio em placa para determinar a quantidade de partículas virais infectantes (PFU). Resumidamente, foram semeadas 1x10<sup>5</sup> de células de rim de porco (Vero), em cada poço de uma placa de 24 poços. Em seguida, foi realizada uma diluição em série do stock viral de ZIKV<sup>BR</sup>, de 10<sup>-1</sup> para 10<sup>-11</sup> utilizando apenas 200 µL de cada diluição em cada poço, durante pelo menos 1 h a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> para permitir a adsorção do vírus. Posteriormente, cada poço foi coberto com meio carboximetilcelulose (CMC) (Sigma-Aldrich, C5013) diluído em meio DMEM Low Glucose (LGC, BR30002-05) suplementado com 2% de SBF na proporção 1:1. Após cinco dias de incubação a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub>, a visualização da placa foi feita utilizando uma solução de coloração cristal violeta (Sigma-Aldrich, V5265).

### 3.4. Cultivo de astrócitos primários murinos

Córtex cerebral de camundongos SJL ou C57BL/6 WT neonatos (1-3 dias) foram dissecados, cuidadosamente retirados suas meninges e digeridos com 0,05% de tripsina-EDTA (Gibco, 25200056) e DNase I (Sigma, 69182, 1 mg/ml<sup>-1</sup>) a 37°C por 10 min. As células foram extraídas pela passagem por *cell strainer* de 70 µM (BD, 352350). Para o cultivo de astrócitos as células foram mantidas em meio DMEM Ham's F12 (LGC, BR30004-05) suplementado com 10% SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 0,05% de anfotericina, 1% de Piruvato, 1% de MEM vitamina (Gibco, 11120-052), 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina

(LGC, BR30034-01). O meio foi substituído a cada 2-3 dias. Após 15 dias, as células atingiram a confluência e os astrócitos foram isolados das micróglia por agitação de 4 h a 200 rpm e 37°C.

### 3.5. Infecção pelo ZIKV *in vitro* e *in vivo*

Os astrócitos foram semeados em placas de 6 poços e infectados ou não com ZIKV<sup>BR</sup>. As amostras virais foram diluídas em meio DMEM Ham's F12 incompleto para o MOI = 1 e adicionadas às células. Para adsorção viral, as células em monocamada foram incubadas durante 1 h à 37 °C e 5% CO<sub>2</sub>. Em seguida, o inóculo foi removido e as células lavadas uma vez com PBS 1x. Em seguida, adicionamos meio de cultura específico, e posteriormente as células foram incubadas a 37 °C e 5% de CO<sub>2</sub> durante 24, 48 ou 72 h após a infecção. Para os experimentos de transmissão vertical, utilizamos animais SJL com 8-12 semanas de idade. No décimo quarto ou décimo quinto dia de gestação as fêmeas prenhes foram infectadas pela via subcutânea com 10<sup>3</sup> ou 10<sup>5</sup> PFU mL<sup>-1</sup> do ZIKV<sup>BR</sup> diluído em 200 µL de PBS 1x, respectivamente, como previamente descrito pelo nosso grupo<sup>35</sup>.

### 3.6. Estimulação dos astrócitos

Os astrócitos primários foram semeados em placas de 6 poços na concentração de 2x10<sup>5</sup> células por poço. Para as análises de inibição do IFNAR-1, no dia seguinte 10 µg/mL de *InVivoPlus* anti-mouse IFNAR-1 (BioXCell, BP0241, clone: MAR1-5A3) ou 10 µg/mL de *InVivoPlus* isotype control (BioXCell, BP0083, clone: MOPC-21) foram diluídos em 2 mL de DMEM Ham's F12 completo e incubados com as células. Após 24h, as células foram infectadas com ZIKV (MOI=1) por 1h. Em seguida, as células foram lavadas e o meio contendo o anti-mouse IFNAR-1 ou isotype control foi devolvido aos astrócitos por mais 72h. Para análises de ativação de TLR3, incubamos as células com 500 ng/mL de Polyinosinic:polycytidylic acid (Poly I:C) (Sigma-Aldrich, PO913) por 72 h.

### 3.7. Imunofluorescência

Os astrócitos foram fixados com paraformaldeído (PFA, Synth, P1005) 4% por 1h a 4°C. Em seguida foi realizada a permeabilização e o bloqueio com solução de albumina bovina sérica (BSA, LGC, A1310) 5% e TritonX 0,5% (LGC, 13-1315-05) por 30 m em temperatura ambiente. Os anticorpos primários foram diluídos em solução de bloqueio e marcados *overnight* a 4°C. No dia seguinte, foi utilizado anticorpos secundários diluídos em solução de

bloqueio por 2 h na ausência de luz a temperatura ambiente. Por fim, foi utilizado DAPI (Invitrogen) para marcação do núcleo celular na diluição 1:5000 em PBS 1x por 10 min no escuro e temperatura ambiente. A observação das marcações foi realizada pelo microscópio ZOE Biorad®. A pureza dos astrócitos foi avaliada pela marcação com primário rabbit anti-GFAP (Abcam, ab7260, 1:500) e lectina de tomate (1:500). Já a infecção pelo ZIKV em astrócitos foi avaliada utilizando o primário mouse anti-4G2 (Millipore, MAB-10216-I, 1:200). Os anticorpos secundários utilizados foram: goat anti-rabbit 555 (Abcam, ab150078, 1:500) e goat anti-mouse 488 (Invitrogen, A28175, 1:500).

### 3.8. Extração de RNA e síntese de cDNA

Os astrócitos e o cérebro dos filhotes foram lisados com 1 mL do reagente Trizol (Invitrogen, 15596018) durante 5 min a temperatura ambiente. À essa solução foram adicionados 200 µL de clorofórmio para separação de RNA, DNA e proteínas, após centrifugação de 12000 g por 15 min. A porção superior (transparente, que contém RNA) foi cuidadosamente retirada e transferida para outro tubo, o qual foi adicionado 500 µL de isopropanol. A mistura foi vortexada e mantida em temperatura ambiente por 10 min. Em seguida, foi centrifugada a 12000 g por 10 min e o sobrenadante retirado cuidadosamente. Ao *pellet* obtido, foi adicionado 1 mL etanol 75% e centrifugado a 7600 g por 5 min a 4 °C e esse processo foi repetido por 3 vezes. Após a última lavagem, o etanol foi retirado e o tubo mantido invertido sobre a bancada até a secagem total do *pellet*. Finalmente, 25 µL de água foram adicionados. A concentração do RNA total purificado foi determinada em espectrofotômetro a 260/280nm (NanoDrop 2000, ThermoFisher). Para a síntese de cDNA para avaliação da expressão de mRNA, foi realizada uma reação de transcrição reversa a partir do RNA total purificado utilizando o High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit (Applied Biosystem, 4368813). Para tanto, 2 µg de RNA diluídos em 14,2 µL foram adicionados a 5,8 µL de mix (2 µL RT buffer, 2 µL de RT random primers, 1 µL de multiscribe e 0,8 µL de dNTPs). A mistura foi levada ao termociclador (QuantStudio3, Applied Biosystems) e submetida aos seguintes ciclos: 25 °C por 10 min; 37 °C por 120 min; e 85 °C por 5 min. Decorridos os ciclos, foram adicionados 180 µL de água DEPC para manter a concentração de cDNA de 10 ng/µL e as amostras foram mantidas a -20 °C até o uso. Para a síntese de cDNA para avaliação da expressão de miRNAs foi realizada uma reação de transcrição reversa para miRNAs maduros utilizando o miScript II RT kit (Qiagen, #218161). Dessa forma, 2 µg de RNA diluídos em 12 µL

foram adicionados a 8 µL de mix (4 µL de 5x miScript HiSpec Buffer, 2 µL de 10x miScript Nucleous mix e 2 µL de miScript Reverse Transcriptase mix). A mistura foi levada ao termociclador (QuantStudio3, Applied Biosystems) e submetida aos ciclos: 37 °C por 60 min e 95 °C por 5 min. Decorridos os ciclos, foram adicionados 180 µL de água DEPC para manter a concentração de cDNA de 10 ng/µL e as amostras foram mantidas a -20 °C até o uso.

### 3.9. Quantificação por PCR em tempo real

A partir do cDNA obtido, foi avaliada a expressão de mRNA por PCR em tempo real (qPCR). A cada reação de PCR, foi adicionado 200 µM do primer forward, 200 µM do primer reverse sintetizados, 5 µL de *SYBR Green Master Mix* (Applied Biosystems, 4309155) e 46 ng de amostra de cDNA em um volume final de 10 µL. As soluções foram levadas ao aparelho *QuantStudio3* (Applied Biosystems) e submetidas aos seguintes ciclos: 1- 50 °C por 2 min; 2- 95 °C por 2 min; 3- 95 °C por 15 seg e 4- 60 °C por 1 min. Os passos 3 e 4 foram repetidos 40 vezes. As curvas foram normalizadas pela expressão da  $\beta$ -actina. Para avaliar a expressão dos miRNAs, a cada reação de PCR foi adicionado 10 µL de 2x miScript SYBR Green, 2 µL de 10x Universal Primer (Qiagen, 2180073), 2 µL Primer específico, 1 µL de água e 50 ng de amostra de cDNA em um volume final de 20 µL. As soluções foram levadas ao aparelho *QuantStudio3* (Applied Biosystems) e submetidas a diferentes estágios (1- 95 °C por 15 seg; 2- 94 °C por 15 seg; 3- 55 °C por 30 seg e 4- 70 °C por 30 seg). Os passos 2-4 foram repetidos 40 vezes. As curvas foram normalizadas pela expressão do miRNA constitutivo *Snord68*. A expressão gênica foi dada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (experimental) –  $\Delta Ct$  (controle), e  $\Delta Ct$  é o Ct do gene alvo subtraído do Ct do gene endógeno. Segue abaixo a lista de primers que foram utilizados nos experimentos de qPCR para avaliação de mRNA (**Tabela 1**) e miRNAs (**Tabela 2**).

Gene	Espécie	Sequência Forward	Sequência Reverse
<b>Actb</b>	camundongo	GGCTGTATCCCCTCCATCG	CCAGTTGGTAACAATGCCATGT
<b>Ahr</b>	camundongo	ACATACGCCGGTAGGAAGAGA	GGTCCAGCTCTGTATTGAGGC
<b>Ahrr</b>	camundongo	ACCAGTCTTGCCTTCTGTAAC	CTTGAGTCCATCGTAACCACAAT
<b>Arnt</b>	camundongo	GACAGACCACAGGACAGTTCC	AGCATGGACAGCATTCTTGAA
<b>Atg4</b>	camundongo	AGATGAAAGCAAGATGTTGCCT	CCCTGTAGGTCAGCCATATTCTA
<b>Bcl2</b>	camundongo	ACGTGGACCTCATGGAGTG	TGTGTATAGCAATCCCAGGCA
<b>Bcl2l11</b>	camundongo	CCCGGAGATACGGATTGCAC	GCCTCGCGGTAATCATTTC

<b>Cebpb</b>	camundongo	CGCCTTATAAACCTCCCGCT	TGGCCACTTCCATGGGTCTA
<b>Ifnar2</b>	camundongo	CTTCGTGTTTGGTAGTGATGGT	GGGGATGATTTCCAGCCGA
<b>Il12a</b>	camundongo	CATCGATGAGCTGATGCAGT	GAAGCAGGATGCAGAGCTTC
<b>Il1b</b>	camundongo	GAAATGCCACCTTTTGACAGTG	TGGATGCTCTCATCAGGACAG
<b>Il6</b>	camundongo	GCCTTCTTGGGACTGATGCT	TGTGACTCCAGCTTATCTCTTGG
<b>Irak1</b>	camundongo	ACTCCAGAGAAGTCCCAACCA	CAGGAATGCAGGGTAGCAGAG
<b>Irak4</b>	camundongo	CATACGCAACCTTAATGTGGGG	GGAAGTATTGTATCTGTCTGTCG
<b>Larp7</b>	camundongo	AAGCAGGTGGACTTCTGGTTT	TCCCATCAGTTGTCAGCTTCT
<b>Nav2</b>	camundongo	GTAGCCTCCAAAATGAAATCGGG	CTCCACCTTGCTTCCCAACT
<b>Neurod4</b>	camundongo	AGCTGGTCAACACACAATCCT	GTTCCGAGCATTCCATAAGAGC
<b>Neurod6</b>	camundongo	TTAACTACTACCGTTTGACGAGTC	TGTTTTGGAAAGCTCTCTGGTT
<b>Nlrp12</b>	camundongo	GGCTTGCTTGCCAGTGTTG	TGCTGGGAGGAGAAACAACC
<b>premiR-294</b>	camundongo	GCCATACTCAAAATGGAGGCC	CATGGCAACACACAAAAGGGA
<b>premiR-295</b>	camundongo	TGAGACTCAAATGTGGGGCA	GGAGAGACTCAAAGTAGTAGCA
<b>premiR-302b</b>	camundongo	GTTCCCTTCAACTTAAACATGGG	ACATGGAAGCACTTACTCTTCG
<b>premiR-302d</b>	camundongo	CTTTAACATGGAGGCACTTGCT	CCCACTCAAACATGGAAGCAC
<b>Rela</b>	camundongo	CTTCCTCAGCCATGGTACCTCT	CAAGTCTTCATCAGCATCAAAGT
<b>Socs1</b>	camundongo	CTGCGGCTTCTATTGGGGAC	AAAAGGCAGTGAAGGTCTCG
<b>Tgfbr1</b>	camundongo	TCTGCATTGCACTTATGCTGA	AAAGGCGATCTAGTGATGGA
<b>Tnfa</b>	camundongo	CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	GCTACGACGTGGGCTACAG
<b>Trak2</b>	camundongo	GCCCAGGCGTCATCACTAAA	TTCTGCTCCAGTTGAAGAGGC
<b>ZIKV</b>	-	TTGGTCATGATACTGCTGATTGC	CCTTCCACAAAGTCCCTATTGC

Tabela 1. Lista de primers para avaliação de mRNA.

Gene	Espécie	Número de catálogo
<b>miR-294</b>	camundongo	MS00001988
<b>miR-295</b>	camundongo	MS00001995
<b>miR-302b</b>	camundongo	MS00003906
<b>miR-302d</b>	camundongo	MS00002072
<b>Snord68</b>	camundongo	MS00033712

Tabela 2. Lista de primers para avaliação de miRNAs.



### 3.10. Análise do perfil dos miRNAs

A partir do RNA total extraído, 2 µg foram submetidos a reação de transcrição reversa apenas para miRNAs maduros (Qiagen). Para tanto, foram utilizados 12 µL do RNA extraído e adicionados a 8 µL de mix (4 µL do 5x miScript HiSpecBuffer, 2 µL do 10x miScript Nucleics Mix e 2 µL de miScript Reverse Transcriptase mix). A mistura foi levada ao termociclador (QuantStudio 3, Applied Biosystems), submetida aos ciclos: 37 °C por 60 min e 95° C por 5 min e adicionados 90 µL de água à essa mistura, totalizando um volume final de 110 µL. Posteriormente, 100 µL do cDNA sintetizado foi misturado com 1375 µL de 2x QuantiTect SYBR Green PCR, 275 µL 10x miScript Universal Primer. Em seguida, 25 µL dessa solução foi adicionada em cada poço de uma placa miScript miRNA PCR Array miFinder (Qiagen – Mouse MIMM-001Z), de 96 poços contendo um primer para cada miRNAs em cada poço. Em sequência, essa placa foi levada ao termociclador (QuantStudio3, Applied Biosystems) e submetida à diferentes estágios (1- 95°C por 15 min; 2- 94°C por 15 seg; 3- 55°C por 30 seg e 70°C por 30 seg). Os passos 2-4 foram repetidos 40 vezes. As curvas foram normalizadas pela expressão de 8 genes endógenos presentes na própria placa. As análises foram feitas através da plataforma de análise da Qiagen: [https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/technology-portals/browse-qpcr/qrt-pcr-for-mrna-expression/data-analysis/~/link.aspx?\\_id=93C80B99536C4FCDBD1E5FC0759F1324&\\_z=z](https://www.qiagen.com/br/shop/genes-and-pathways/technology-portals/browse-qpcr/qrt-pcr-for-mrna-expression/data-analysis/~/link.aspx?_id=93C80B99536C4FCDBD1E5FC0759F1324&_z=z).

### 3.11. Análise de predição das interações mRNA-miRNA.

Para prever os possíveis mRNAs alvos modulados pelos *miRNAs* regulados durante a infecção pelo ZIKV utilizamos plataformas on-line grátis. As análises foram feitas no mirWalk 2.0, uma plataforma que compara as análises de outros sites (PITA - *Probability of Interaction by Target Accessibility*, TargetScan e miRanda).

### 3.12. Uso de miRNAs inibidores e mímicos.

Para os ensaios de inibição e uso dos mímicos dos miRNAs *in vitro*, os astrócitos primários foram semeados em placas de 6 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço. No dia seguinte, 20 nM de *miRVana miRNA* inhibitor (Thermo Fisher, #4464084) ou *miRVana miRNA* Mimic (Thermo Fisher, #4464058) foi misturado com 8 µL de Fugene (Promega, #E2311) em 2 mL de DMEM Ham's F12 completo. A mistura foi incubada por 20 min em temperatura ambiente e adicionada aos astrócitos anteriormente semeados. Após 24h, as

células foram infectadas com ZIKV (MOI=1) por 1h. Em seguida, as células foram lavadas e o meio contendo os inibidores ou mímicos foi devolvido aos astrócitos por mais 72h. Para o uso de miRNAs mímicos *in vivo*, utilizamos 10 µL de invivolectamine 3.0 Reagent, 2 µL de complexation buffer (Invitrogen, #IVF3001) e 2 µL do mímico (Thermo Fisher, #4464058) contendo 50 pmol/µL. Incubamos essa solução por 30 min a 50°C e fizemos uma injeção intracerebroventricular de 6 µL em cada hemisfério de animais SJL com 1 dia de vida. Paralelamente, injetamos  $1 \times 10^4$  de ZIKV<sup>BR</sup> em cada hemisfério. Após 24 horas da injeção dos mímicos ou do ZIKV, retiramos o cérebro dos filhotes para extração de RNA e análise de expressão gênica. Negative Control #1 (#4464076 - scramble), miR-295-3p (miRBase Accession MIMAT0000373) e o miR-302d-3p (miRBase Accession MIMAT0003377).

### 3.13. Uso de RNA de interferência (siRNA).

Para os ensaios com o uso de RNA de interferência (siRNA) *in vitro*, os astrócitos primários foram semeados em placas de 6 poços na concentração de  $2 \times 10^5$  células por poço. No dia seguinte, 100 nM de ON-TargetPlus Non-targeting (NT) (Horizon, D-001819-10-05), ON-TargetPlus mouse Cebpb siRNA Smartpool (siCebpb) (Horizon, L-043110-00-0005), ou ON-TargetPlus mouse Rela siRNA Smartpool (siRela) (Horizon, L-040776-00-0005) foi misturado com 8 µL de Fugene (Promega, #E2311) em 2 mL de DMEM Ham's F12 completo. A mistura foi incubada por 20 min em temperatura ambiente e adicionada aos astrócitos anteriormente semeados. Após 24h, as células foram infectadas com ZIKV (MOI=1) por 1h. Em seguida, as células foram lavadas e o meio contendo os siRNAs foi devolvido aos astrócitos por mais 72h.

### 3.14. Construtos pmiRGLO e ensaio de luciferase

Os construtos pmiRGLO foram projetados para o vetor de expressão alvo de miRNA de Dual-Luciferase pmirGLO (Promega) e o 3' UTR dos genes continha a sequência prevista para a interação com os miR-295 e miR-302d. Segue abaixo a tabela das sequências inseridas no vetor:

Gene	Sequência
miR-295-Bcl2l11 sense	ctagcggccgctagccgagtaaAGCACTTgtcttcact
miR-295-Bcl2l11 antisense	ctagagtggaagacAAGTGCTtactcggctagcggccgctagagct
miR-295-Bcl2l11 mis sense	ctagcggccgctagccgagtaaCTTGCTTgtcttcact
miR-295-Bcl2l11 mis antisense	ctagagtggaagacAAGCAAGttactcggctagcggccgctagagct

miR-295/302d-Neurod4 sense	ctagcggccgctacttattgcAGCACTTactctgctct
miR-295/302d-Neurod4 antisense	ctagagagcagagtAAGTGCTgcaataagtagcggccgctagagct
miR-295/302d-Neurod4 mis sense	ctagcggccgctacttattgcAGCACTTactctgctct
miR-295/302d-Neurod4 mis antisense	ctagagagcagagtAAGCAAGgcaataagtagcggccgctagagct
miR-295/302d-Neurod6 sense	ctagcggccgctaaaaatattAGCACTTgttttgatt
miR-295/302d-Neurod6 antisense	ctagaatacaaacAAGTGCTaatatTTTTtagcggccgctagagct
miR-295/302d-Neurod6 mis sense	ctagcggccgctaaaaatattCTTGCTTgttttgatt
miR-295/302d-Neurod6 mis antisense	ctagaatacaaacAAGCAAGaatatTTTTtagcggccgctagagct
miR-295/302d-Ahrr sense	ctagcggccgctatgaatcccAGCACTTgagtgattgt
miR-295/302d-Ahrr antisense	ctagacaatcactcAAGTGCTgggattcatagcggccgctagagct
miR-295/302d-Ahrr mis sense	ctagcggccgctatgaatcccCTTGCTTgagtgattgt
miR-295/302d-Ahrr mis antisense	ctagacaatcactcAAGCAAGgggattcatagcggccgctagagct

**Tabela 3.** Lista de seqüências inseridas no vetor para o ensaio de luciferase.

As células HEK-293T foram semeadas em placas de 24 poços a  $5 \times 10^5$  células por poço. No dia seguinte, 250  $\mu$ L de meio RPMI 1640 sem soro (LGC Biotecnologia, BR30011-05) contendo 5  $\mu$ g dos construtos pmiRGLO, 100 nM de miR-295 ou miR-302d mímico ou controle negativo (*scramble*) e 5  $\mu$ L do reagente de transfecção FugeneHD foram previamente incubados com por 20 min em temperatura ambiente e, em seguida adicionados a células HEK-293T previamente semeadas por poço. Após 4 h, foi adicionado FBS na concentração de 5% e incubado por 24 h. Para o ensaio de atividade de luciferase, as células de cada poço foram coletadas, ressuspensas em 75  $\mu$ L de meio RPMI-1640 completo e incubadas com 75  $\mu$ L de reagente Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase por 10 min em temperatura ambiente e a luminescência de *firefly* luciferase foi medida no luminômetro. Em seguida, a luminescência da *renilla* luciferase foi analisada por incubação com 75  $\mu$ L de Substrato Dual-Glo<sup>®</sup> Stop-Glo<sup>®</sup> por 10 min em temperatura ambiente. Os reagentes utilizados foram do kit Dual-Glo<sup>®</sup> Luciferase Assay (Promega, E2920) e o luminômetro utilizado foi o Luminômetro de Microplacas GloMax<sup>®</sup> 96 (Promega, GM3000). Os valores de *firefly* luciferase foram normalizados por *renilla* luciferase e, em seguida, normalizados pelos valores obtidos com células transfectadas na presença do controle negativo dos mímicos.

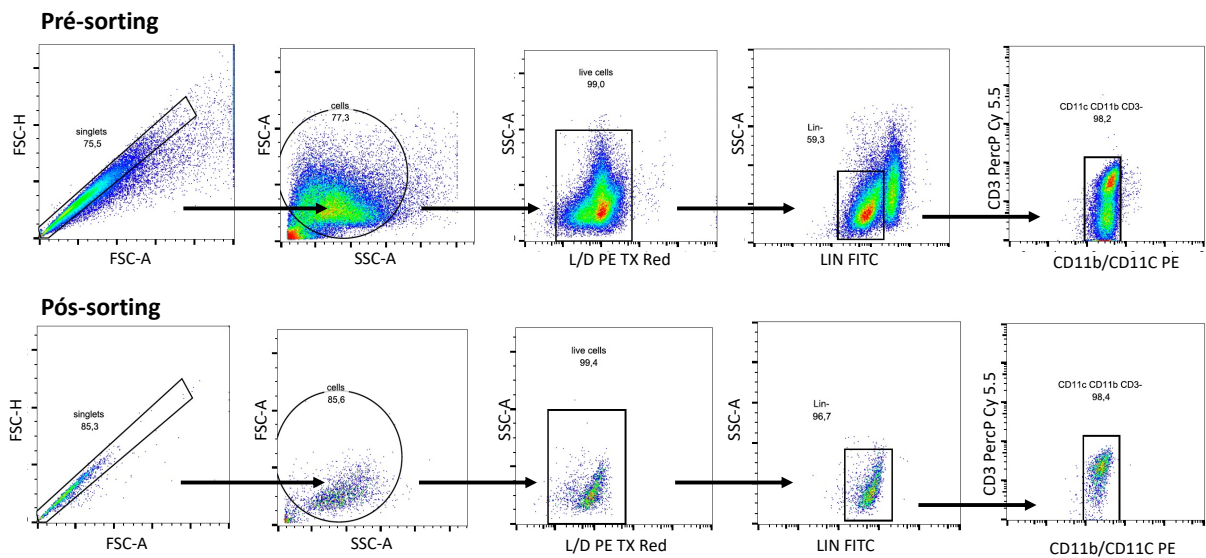
### 3.15. Western Blotting (WB)

Os astrócitos foram lisados em tampão RIPA 1x (Sigma-Aldrich, R0278), com inibidor de protease (Invitrogen, A32963) e de fosfatase (Invitrogen, A32957) por 15 min no gelo. Em seguida, o lisado foi centrifugado por 10 min a 12000 g a 4°C. O sobrenadante foi congelado a -80°C até a dosagem de proteínas pelo método Bradford (Thermo Fisher, 23200). Foram diluídos 50 µg de proteína em 15 µL de tampão de corrida 2x Laemmli Sample Buffer (Bio-Rad, 1610737), e posteriormente submetidos a linearização e regulação da carga por incubação a 95°C por 5 min. Em seguida, as amostras foram aplicadas em poços de gel de poliacrilamida 12% corridos em 80-115V por aproximadamente 90 min. Após a corrida, foi realizada a transferência para a membrana de PVDF, previamente ativada com metanol, sob amperagem controlada de 350 mA por 2h. Ao final da corrida, a membrana foi bloqueada com solução de albumina de soro bovino (ASB) 5% (LGC, 9048-46-8) em tampão TBS-T por 1h. Posteriormente, incubamos a membrana com o anticorpo primário dirigido para a proteína p65 do NF-κB (Cell Signaling, 8242, 1:1000) overnight a 4°C, e com o anticorpo secundário anti-rabbit 1:5000 (Cell Signaling, 7074) por 2h em temperatura ambiente. A membrana foi lavada com TBS-T 1X por três vezes no final de cada incubação. Em seguida, a solução ECL (Bio-Rad, 1705061) foi aplicada sobre a membrana e a imagem captada por meio do aparelho *G-BOX* (Syngene).

### **3.16. Cell sorting de astrócitos murinos**

Os animais SJL foram infectados no 15º dia da gestação (E15) com ZIKV<sup>BR</sup> e após 3 dias o cérebro dos filhotes foi retirado e processado. Para tanto, colocamos 3 cérebros em um tubo cônico de 50 mL estéril e incubamos com 2,5 mg/mL colagenase D (Sigma-Aldrich, 11088858001) em HBSS com cálcio e magnésio (LGC, BR30015-05) durante 45 min a 37 °C. Após esse período, a reação da enzimática foi parada com a adição de 15 mL de HBSS 1x sem cálcio e magnésio (LGC, BR20016-05) acrescido de 0,5 mM de EDTA (Sigma-Aldrich, #E9884). Então as amostras foram processadas em *cell strainers* de 70 µM e centrifugadas a 500 g por 5 min a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em 6 mL de Percoll (GE, GE17-0891-01) a 25%. Essa suspensão foi adicionada lentamente sobre 2 mL de Percoll 75% em tubos cônicos de 15 mL e centrifugada por 20 min a 900 g, 22 °C com freio desligado. O sobrenadante foi descartado e o anel contendo células mononucleares foi armazenado e lavado com 15 mL de HBSS 1x sem cálcio e sem magnésio e centrifugado por 5 min, 400 g a 4 °C. O pellet foi ressuscitado em meio RPMI contendo 10% de SFB, 1% de penicilina e estreptomicina, 0,05% de anfotericina, 1% de Piruvato, 1% de vitamina, 1% de aminoácidos não essenciais e 1% de L-glutamina na

diluição de  $1 \times 10^7$  células/mL. Em seguida, as células foram marcadas com FITC anti-CD105 (Invitrogen, MA5-17945, 1:100), FITC anti-CD140a (eBioscience, 11-1401-82, 1:100), FITC anti-TER119 (Invitrogen, 11-5921-82, 1:100), FITC anti-CD45 (BioLegend, 103108, 1:100), FITC anti-CD45R/B220 (Invitrogen, 11-0452-82, 1:100), FITC anti-Ly6G (eBiosciences, 11-9668-82, 1:100), FITC anti-O4 (R&D Systems, FAB1326G, 1:100), PE anti-CD11b (Biolegend, 101208, 1:100), PE anti-CD11c (Biolegend, 117308, 1:100), PercP-Cy5.5 anti-CD3 (Tonbo Bioscience, 65-0031-U100, 1:100), BV570 anti-Ly6C (Biolegend, 128030, 1:100), e Zombie Red Fixable Viability (Biolegend, 423110, 1:2000) por 30 min a 4°C. As células foram submetidas a *cell sorting* em citômetro Moflo Astrios (Beckman Coulter). A compensação foi realizada utilizando UltraComp eBeads de compensação (Invitrogen, 01-2222-42). Os astrócitos viáveis são as células negativas para todos os marcadores anteriormente descritos e foram isolados com pureza variável entre 88-95% (**Figura 2A-B**).

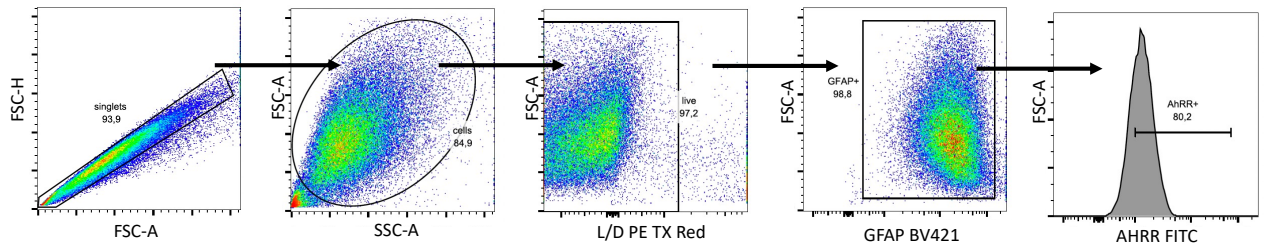


**Figura 2: Estratégia de *gate* para o isolamento de astrócitos por *cell sorting*.** **A)** Pré *sorting* sendo os astrócitos negativos para todos os marcadores. **B)** Pós *sorting*, o qual as amostras foram avaliadas quanto ao rendimento e pureza do isolamento dos astrócitos.

### 3.17. Citometria de fluxo

Os astrócitos foram removidos das placas por tripsinização, lavados e bloqueados durante 20 min com anticorpos monoclonais anti-CD16/32 (Fc Block) (eBioscience, 14-0161-82) a 4 °C. Em seguida, foram lavados e incubados durante por 30 min a 4 °C com Zombie Red Fixable Viability (Biolegend, 423110, 1:2000). Depois, as células foram novamente lavadas, ressuspendidas em 100 µL de Cytotfix/Cytoperm kit (BD Biosciences, 554714), incubadas por 20

min a 4 °C e lavadas com 100 µL de BD Perm/Wash. Após este processo, as células foram incubadas com o coquetel de anticorpos: GFAP anti-mouse (XXX) e AhRR anti-mouse (XXX) por 30 min a 4 °C, lavadas e ressuspendidas em 200 µL de MACS buffer. A aquisição dessas células foi através do citômetro de fluxo BD Accuri C6 (BD Biosciences). A compensação foi realizada utilizando UltraComp eBeads de compensação e a análise foi feita no software FlowJo 10 (Figura 3).



**Figura 3: Estratégia de *gate* para análise da proteína AhRR por citometria de fluxo.** Avaliamos a expressão da proteína AhRR nos astrócitos vivos e positivos para GFAP.

### 3.18. Imunoprecipitação de cromatina (ChIP)

Aproximadamente  $1 \times 10^6$  de astrócitos infectados ou não com ZIKV (MOI=1) foram preparados de acordo com o protocolo ChIP-IT Express Enzymatic Shearing and ChIP (Active Motif, 53009). Resumidamente, as células foram fixadas em formaldeído a 1% por 10 min com agitação leve e lavadas com PBS 1X e fixação parada pelo uso de glicina 1X por 5 min. Em seguida, foi adicionado PBS 1X suplementado com 500 µM de PMSF e as células foram raspadas utilizando *cell scraper* (Kasvi, K26-0025). As células foram centrifugadas 500 g por 5 min a 4 °C, e a cromatina isolada e quebrada utilizando o *Enzymatic Shearing Cocktail* por 10 min a 37 °C vortexando a cada 2 min. A cromatina cortada foi imunoprecipitada durante 16 h a 4 °C com rotação pelo uso de *beads* magnéticas e dos anticorpos: CEBP/β anti-mouse (Abcam, 15050, 10 µg), p65 NF-κB (Cell Signaling, 8242, 10 µg) e isotipo controle (Abcam, 37355). No dia seguinte, as esferas magnéticas contendo a cromatina específica foram lavadas 1X com tampão ChIP 1, 1X com tampão ChIP 2 e 1X com TE 1X. A cromatina foi eluída utilizando 100 µL de TE 1X a 65 °C por 4 h. O DNA foi purificado usando o Purelink Kit de Purificação de DNA genômico (Invitrogen, K182001). A cada reação de PCR, foi adicionado 200 µM do primer forward, 200 µM do primer reverse sintetizados, 5 µL de *SYBR Green Master Mix* e 20 ng de amostra de cDNA em um volume final de 10 µL. As soluções foram levadas ao aparelho *QuantStudio3* (Applied Biosystems) e submetidas aos seguintes ciclos: 1- 50 °C por 2 min; 2- 95 °C por 2 min; 3- 95 °C por 15 seg e 4- 60 °C por 1 min. Os passos 3 e 4 foram repetidos 40

vezes. As curvas foram normalizadas pela expressão do gene durante a imunoprecipitação com isotipo controle. A expressão gênica foi dada pela fórmula  $2^{-\Delta\Delta Ct}$ , onde  $\Delta\Delta Ct = \Delta Ct$  (ZIKV) –  $\Delta Ct$  (controle), e  $\Delta Ct$  é o Ct do gene alvo imunoprecipitado com Cebpb ou Rela subtraído do Ct do gene alvo imunoprecipitado com isotipo controle. Segue abaixo a lista de primers utilizados nos experimentos de CHIP (**Tabela 3**).

Gene	Sequência Forward	Sequência Reverse
<b>Larp7-Rela sítio 1</b>	CCCGGCTTCGAAAGACTACT	AGTGGAGAGTTCATTGAGAATGG
<b>Larp7-Cebpb sítio 1</b>	CTTCTGACTTCTGTGGGCATC	ACCTGTGGAAGAGCAGTCAGT
<b>Nlrp12-Cebpb sítio 1</b>	ATCCAACCGTAAGCATGACC	AGCAGAAGCTTGCTCAATGT

**Tabela 4.** Lista dos primers que foram utilizados nos experimentos de CHIP.

### 3.19. Histologia do cérebro de neonatos

Os cérebros foram removidos do crânio, fixados em paraformaldeído 4% gelado diluído em PBS 1X durante aproximadamente 16 h, e crioprotetidos em solução de sacarose 30% diluído em PBS 1X a 4 °C por até 24 h. As amostras foram então congeladas em gelo seco, seccionadas no plano coronal a 20 µm de espessura em um criostato semiautomático (Leica Microsystems, 1850 UV) e montadas em lâminas *Superfrost Plus* (VWR International, 48311-703). As lâminas foram secas por 48 h, lavadas em água destilada por 2 min, incubadas em hematoxilina de Harris por 2 min e depois lavadas em água corrente para remover o excesso por 4 min. As lâminas foram então incubadas em eosina por 2 min, desidratadas em concentrações crescentes de etanol e diafanizadas com solução de xilol por 5 min e tampadas com meio de montagem DPX (Sigma-Aldrich, 06522). As imagens foram adquiridas com um microscópio EVOS XL Core (Thermo Fisher Scientific) e analisadas usando o software Image J.

### 3.20. Sequenciamento de RNA do cérebro de neonatos.

A extração total de RNA de quatro replicatas biológicas independentes comparando infectados com ZIKV com controles não infectados, foi realizada usando Trizol conforme descrito acima. Em seguida, as amostras de RNA foram tratadas com DNase I (1U/µg de RNA, Thermo Scientific) a 37 °C por 1 h. A integridade do RNA foi avaliada usando Agilent 2100 Bioanalyzer e o kit Pico Agilent 600 (Agilent Technologies). Do RNA total, 1 µg foi usado para preparar 12 pequenas bibliotecas de RNA com o TruSeq Small RNA Library Prep Kit (Illumina) conforme descrito nas instruções do fabricante. 500 ng do mesmo RNA total foi utilizando

para preparar as 12 bibliotecas com o kit TruSeq Stranded Total RNA Samples Preparation com Ribo-Zero Gold (Illumina). Para verificar os tamanhos das bibliotecas, aplicamos o 2100 Bioanalyzer System com o Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent). As bibliotecas foram quantificadas por qPCR usando um KAPA Library Quantification Kit para plataformas Illumina (KAPA Biosystems). O sequenciamento foi realizado em um sistema NextSeq 500 (Illumina). Para as pequenas bibliotecas de RNA, usamos um kit NextSeq 500/550 High Output v2 (75 ciclos), e foram obtidas leituras de extremidade única de 1x50 pb. Usamos um kit NextSeq 500/550 High Output v2 (150 ciclos) para as bibliotecas de transcriptoma, e foram obtidas leituras pareadas de 2x75 bp.

### **3.21. Mapeamento de bibliotecas de RNA-seq e análise de expressão gênica diferencial.**

O RNA-seq foi realizado a partir do cérebro de neonatos SJL, comparando infectados com ZIKV com controles não infectados. Inicialmente as leituras brutas serviram como entrada para o Trimmomatic 0.40<sup>106</sup>, que realizava filtragem de qualidade removendo sequências adaptadoras Illumina, bases de baixa qualidade (qualidade de pontuação phred > 20) e leituras curtas (PE -phred33 ILLUMINACLIP:truseq.fa :2:30:10 LEADING:3 TRAILING:3 SLIDINGWINDOW:3:20 MINLEN:36). O corte foi seguido pela correção do erro de leitura pelo algoritmo baseado em k-mer SGA<sup>107</sup> versão 0.9.9 com configurações padrão. Em seguida, as leituras foram mapeadas contra o Genome Reference Consortium Mouse Build 38 (GRCm38) usando o software HISAT2 2.2.1<sup>108</sup> seguindo a otimização descrita anteriormente<sup>109</sup> (--rna-strandness RF - -dta --threads 10 -N 1 -L 20 -i S,1,0,5 -D 25 -R 5 --pen-noncansplice 12 --mp 1,0 --sp 3,0). A chamada de expressão gênica diferencial foi alcançada inicialmente pela contagem do número de leituras em cada transcrito através do HTSeq<sup>110</sup> 1.99.2 com as seguintes configurações: -f bam -r pos -s no -a 10 -t exon -i gene\_id -m intersection-nonempty. Por fim, os dados de contagem foram direto para análise diferencial com o pacote DESeq2 (versão 1.34.0) R 4.1.2<sup>111</sup> com configurações padrão. A busca de termos de Gene Ontology do processo biológico foi realizada através do banco de dados online PANTHER 17.0 com parâmetros padrões<sup>112</sup>.

### **3.22. Reconstrução do *network* entre mRNAs-miRNAs.**

O gráfico da reconstrução de rede (network) entre os mRNAs-miRNAs foi feito através da função graph\_from\_incidence\_matrix do pacote igraph (versão 1.3.2) R 4.1.2. A matriz de



incidência foi construída a partir das informações obtidas da análise computacional de miRNAs realizada com o mirWalk 2.0. Em seguida, foi combinado com os dados obtidos da análise diferencial de expressão gênica e *gene ontology*, descritos anteriormente, para gerar a reconstrução da rede.

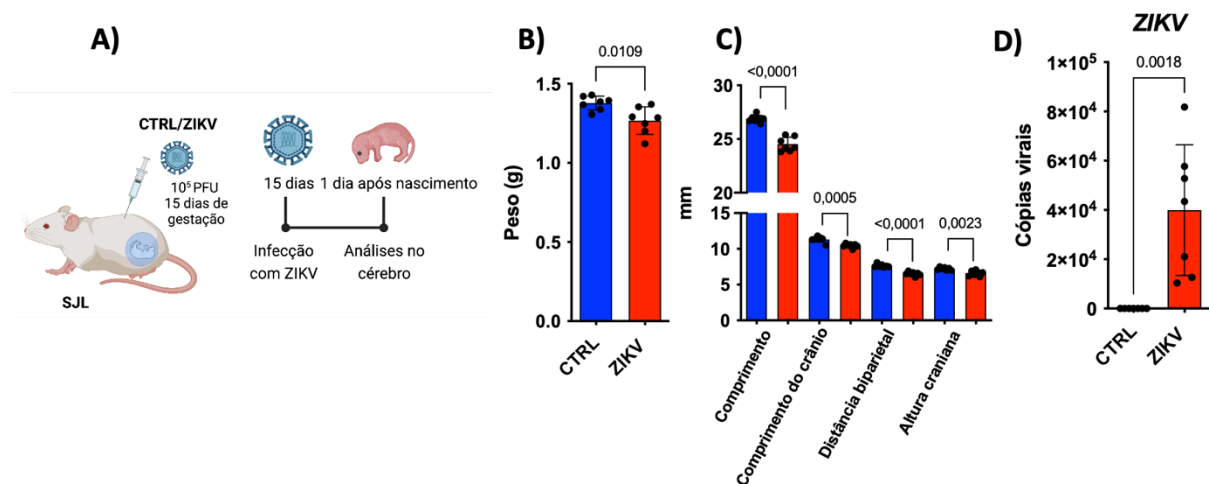
### **3.23. Análise estatística**

Todas as análises estatísticas foram realizadas com o auxílio do software computacional *Graphpad Prism (Graphpad Software Incorporation)* versão 9. As diferenças entre as médias dos resultados obtidas nos experimentos foram determinadas pelo teste *t* student, por One-way ANOVA ou Two-way ANOVA dependendo do número de grupos e variáveis. Foi estabelecido como nível mínimo de significância  $p < 0,05$ .

## 4. RESULTADOS

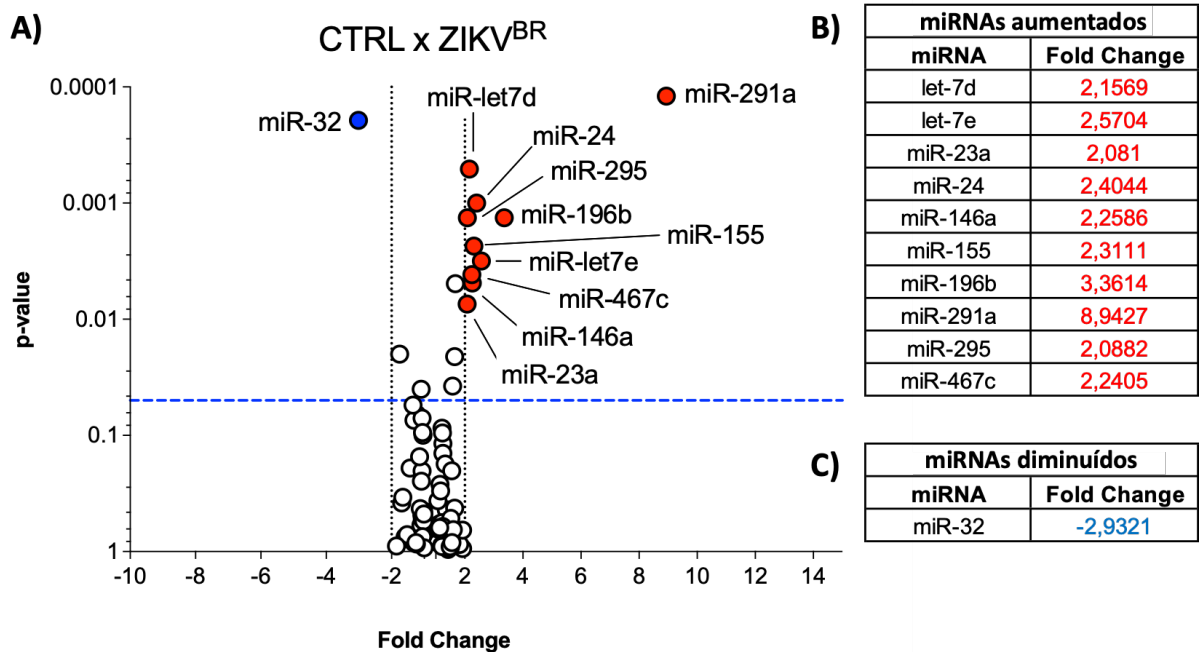
### 4.1. ZIKV é capaz de modular o perfil de miRNAs no cérebro de animais nascidos de mães infectadas.

Para iniciar as análises de perfil de expressão de miRNAs, primeiramente realizamos o nosso modelo de transmissão vertical do ZIKV<sup>35</sup>. Para isso, infectamos camundongos SJL prenhes na data embrionária 15 (E15) com  $10^5$  PFU ZIKV e fizemos as avaliações um dia após o nascimento (**Figura 4A**). Nós observamos restrição do crescimento intrauterino, caracterizada pela diminuição do peso (**Figura 4B**) e do comprimento total do feto, além das medidas cranianas como, o comprimento do crânio, a distância biparietal e altura craniana (**Figura 4C**), e confirmamos a presença do vírus no cérebro desses filhotes (**Figura 4D**).



**Figura 4. Transmissão vertical pelo ZIKV.** **A)** Animais SJL fêmeas prenhes (N=3) foram infectadas via subcutânea com  $10^5$  PFU em 20  $\mu$ L de PBS 1X em E15. Os animais controles receberam o mesmo volume de PBS 1X pela mesma via de inoculação no mesmo período de gestação. Figura criada no BioRender.com. Um dia após o nascimento (N=7) observamos **B)** restrição do crescimento intrauterino, sendo confirmado pelo **C)** comprimento do crânio, distância biparietal e altura craniana dos neonatos. **D)** Cópia do gene do ZIKV por qPCR. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Em seguida, ao compararmos o perfil de miRNAs no cérebro de animais SJL nascidos de mães infectadas com o cérebro de filhotes nascidos de mães não infectadas (**Figura 5A**), observamos que dez miRNAs foram regulados positivamente, sendo eles, let-7d, let-7e, miR-23a, miR-24, miR-146a, miR-155, miR-196b, miR-291a, miR-295 e miR-467 (**Figura 5B**), e que apenas o miR-32-5p foi regulado negativamente pelo ZIKV (**Figura 5C**).



**Figura 5. ZIKV modula o perfil de miRNAs no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas.** O cérebro dos filhotes nascidos de mães infectadas ou não infectadas, foi coletado e submetido ao protocolo para análise miRNAs utilizando o miScript miRNA PCR Array miFinder (Qiagen – Mouse MIMM-001Z). **A)** Volcano Plot, sendo os pontos brancos os inalterados, os pontos vermelhos regulados positivamente e os azuis os miRNAs regulados negativamente. **B)** Tabela dos miRNAs regulados positivamente; **C)** Tabela dos miRNAs regulados negativamente. Linha tracejada preta representa a delimitação de Fold Change de 2, e a linha tracejada azul representa p=0,05. Cada placa representa um pool das amostras (N=3) de cada um dos três experimentos independentes.

#### 4.2. Predição dos genes modulados pelos miRNAs regulados pelo ZIKV no cérebro de animais nascidos de mães infectadas.

Tão importante quanto saber quais miRNAs estão sendo regulados pelo ZIKV, é saber quais mRNAs esses miRNAs têm como alvo. Para isso, utilizamos a plataforma *mirWalk 2.0*, que realiza a comparação de 3 bancos de dados, o *TargetScan*, *PITA* e *miRanda*, utilizando o teste estatístico Bonferroni e considerando os genes estatisticamente modulados quando o valor de  $p < 0.05$ . O *TargetScan* foi desenvolvido pelo grupo de Bartel em 2003 e foi o primeiro algoritmo criado para prever alvos de miRNAs em vertebrados e, desde então, o aperfeiçoaram, e hoje há novas versões disponíveis para prever com mais acurácia em diversas espécies de acordo com a conservação filogenética e evolutiva<sup>113</sup>. Por outro lado, o *PITA* é uma plataforma que faz a predição tendo como parâmetro a energia livre, além disso, usa essa energia livre para calcular a acessibilidade ao local de ligação na 3' UTR. Esta estimativa é realizada considerando que o mRNA adota uma estrutura secundária, portanto o local ao qual um miRNA específico irá interagir deve ser acessível<sup>114</sup>. Já o *miRanda* utiliza como

parâmetros a conservação e energia livre e acessível<sup>115</sup>. Portanto, utilizar uma plataforma que compara os resultados desses três reflete em uma predição mais confiável da interação da região *seed* do miRNA, a região de 7 nucleotídeos do miRNA situada na posição 2-7 a partir do 5' miRNA, com a sequência do mRNA<sup>116</sup>. O uso destas ferramentas nos mostrou os possíveis mRNAs-alvos dos miRNAs modulados. Como sabido, os miRNAs são muito promíscuos, uma vez que são compostos de 20-24 nucleotídeos e as chances da região *seed* dos miRNAs serem complementares a diversos mRNAs é muito grande. Portanto, quando realizamos as análises de predição, uma lista imensa de dados preditos foi gerada, mas nós demos destaque apenas aos mRNAs envolvidos principalmente em resposta imune, neurodesenvolvimento e morte celular.

Interessantemente, entre os genes preditos para modulação pelo miR-32-5p regulado negativamente, estão: 1) *Ubezv* e *Usp28*, relacionados com via de proteólise mediada por ubiquitinas; e 2) *Myo1b* e *Myo10* envolvidas na regulação do citoesqueleto (**Tabela 4**).

miRNA	Gene	Função/Características
mmu-miR-32-5p	<i>Ubezv</i>	Ubiquitina
	<i>Usp28</i>	Ubiquitina
	<i>Myo1b</i>	Miosina estrutural da célula
	<i>Myo10</i>	Miosina estrutural da célula

**Tabela 5.** Genes alvos preditos dos miRNAs regulados negativamente pelo ZIKV no cérebro de filhotes.

Nossos resultados demonstraram que os miRNAs que foram regulados positivamente têm como alvos preditos diversos genes envolvidos em respostas pró-inflamatórias (**Tabela 5**). Genes relacionados às citocinas e quimiocinas, como do receptor da IL-4 e IFN- $\lambda$ , da quimiocina CXCL5 e da citocina pró-inflamatória TNF- $\alpha$  são possíveis alvos. Além desses, podemos destacar: 1) As MAP quinases, *Map2k6* e *Mapkapk3*; 2) Os genes *Bnip2*, *Bcl2L11* e *Atg4c* que estão envolvidos com a morte celular; 3) Os genes de sinalização celular de receptores, como *Socs1*, *Trak2*, *Irak1*, *Foxo1*, *Nfat*, *Irak4*; 4) Repressor da via de sinalização do receptor de aril hidrocarboneto, o *Ahrr* (do inglês – *aryl hydrocarbon receptor repressor*); e 5) genes de crescimento e proteção neuronal, *Nav2*, *Neurod4*, *Neurod6* e *Selt*.

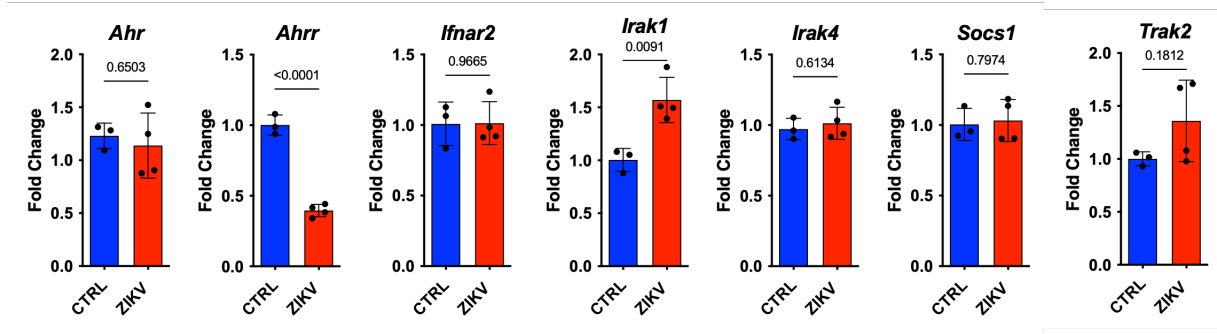
miRNA	Gene	Função
mmu-let-7d-5p	<i>Nfatc1</i>	Fator de transcrição de linfócitos T ativados
	<i>Tnfsf15</i>	Citocina pró-inflamatória
mmu-let-7e-5p	<i>Nfatc1</i>	Fator de transcrição de linfócitos T ativados
	<i>Tnfsf15</i>	Citocina pró-inflamatória

<b>mmu-miR-23a-3p</b>	<i>Nav2</i>	Crescimento neuronal
	<i>Map2k6</i>	MAP quinase essencial para diversos processos celulares
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica
<b>mmu-miR-24-3p</b>	<i>Bnip2</i>	Proteção da morte celular induzida por vírus
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica
	<i>Atg4c</i>	Cisteína necessária para autofagia
	<i>Selt</i>	Proteção de neurônios dopaminérgicos
	<i>Socs1</i>	Fator de transcrição da via de Interferon
<b>mmu-miR-155-5p</b>	<i>Trak2</i>	Proteína adaptadora para motilidade mitocondrial
	<i>Socs1</i>	Fator de transcrição da via de Interferon
<b>mmu-miR-146a-5p</b>	<i>Irak1</i>	Sinalização de Receptores semelhantes à Toll
	<i>Socs1</i>	Fator de transcrição da via de Interferon
<b>mmu-miR-196b-5p</b>	<i>Il4ra</i>	Unidade alfa do receptor de IL-4
	<i>Foxo1</i>	Regulação do ciclo celular
	<i>Cxcl5</i>	Quimioatratador
<b>mmu-miR-291a-3p</b>	<i>Irak4</i>	Sinalização de Receptores semelhantes à Toll
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica
<b>mmu-miR-295-3p</b>	<i>Ifnlr1</i>	Receptor de Interferon Lambida
	<i>Ahrr</i>	Repressor da sinalização do receptor de aril hidrocarboneto
	<i>Neurod6</i>	Pertence à família de fatores de diferenciação neuronal
	<i>Neurod4</i>	Pertence à família de fatores de diferenciação neuronal
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica
<b>mmu-miR-467c-5p</b>	<i>Mapkapk3</i>	MAP quinase
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica

**Tabela 6.** Genes alvos preditos dos miRNAs regulados positivamente pelo ZIKV no cérebro de filhotes. Cores iguais significam miRNAs da mesma família.

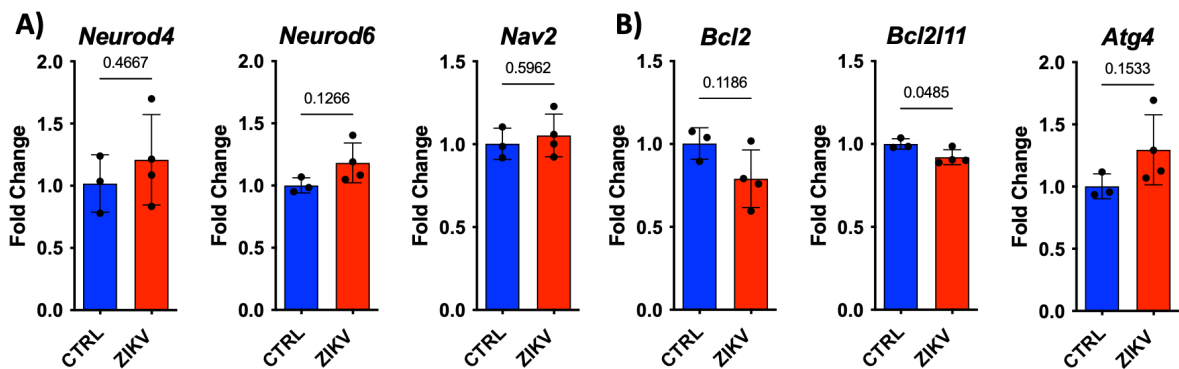
#### 4.3. Avaliação da expressão do mRNA-alvos dos miRNAs regulados pelo ZIKV no cérebro de animais nascidos de mães infectadas.

Em seguida, avaliamos alguns dos mRNA alvos preditos e os separamos em genes relacionados à resposta imune, neurodesenvolvimento e morte celular. Ao avaliarmos os genes envolvidos na resposta imune observamos que a infecção pelo ZIKV diminuiu a expressão de *Ahrr*, um gene alvo do miR-295 regulado positivamente. Além disso, observamos um aumento de *Irak1*, um alvo predito do miR-146a que também se encontra aumentado, portanto, suas expressões não se correlacionam. Todos os outros genes avaliados não sofreram alteração pela infecção (**Figura 6**).



**Figura 6. Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV envolvidos na resposta imune antiviral no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas.** Animais SJL fêmeas prenhes foram infectadas via subcutânea com  $10^5$  PFU ZIKV em 20  $\mu$ L de PBS 1X em E15. Os animais controles receberam o mesmo volume de PBS pela mesma via de inoculação no mesmo período de gestação. Um dia após o nascimento, o cérebro dos filhotes (N=3-4) foi coletado e o mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica de alvos envolvidos com a resposta imune antiviral. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Embora nenhum dos genes avaliados de neurodesenvolvimento tenham sido alterados no cérebro total com a infecção pelo ZIKV (**Figura 7A**), observamos a diminuição da expressão do gene anti-autofágico *Bcl2l11* que é alvo do miR-295 aumentado pela infecção (**Figura 7B**).

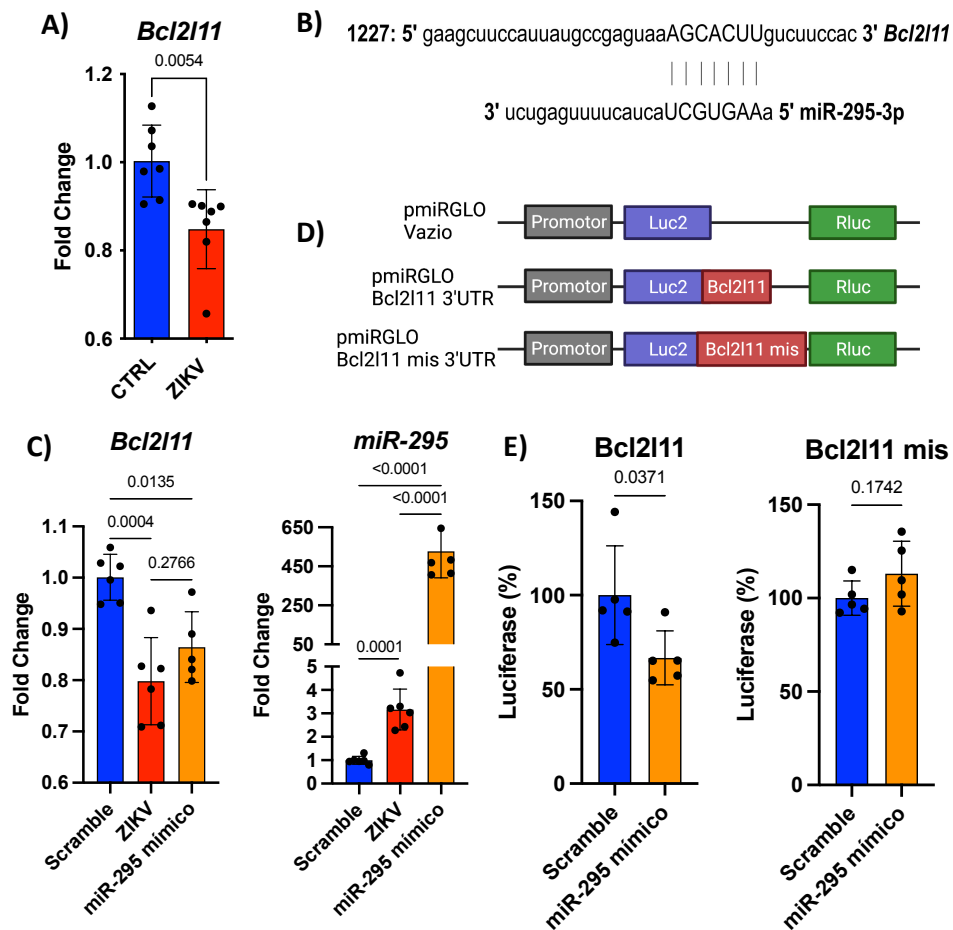


**Figura 7. Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV relacionados com morte celular e neurodesenvolvimento no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas.** Animais SJL fêmeas prenhes foram infectados via subcutânea com  $10^5$  PFU em 20  $\mu$ L de PBS 1X em E15. Os animais controles receberam o mesmo volume de PBS pela mesma via de inoculação no mesmo período de gestação. Um dia após o nascimento, o cérebro dos filhotes (N=3-4) foi coletado e seu mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica de alvos envolvidos com **A)** neurodesenvolvimento e **B)** morte celular. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

#### 4.4. ZIKV aumenta a expressão de miR-295 para diminuir *Bcl2l11* e favorecer a autofagia no cérebro de filhotes SJL.

A partir dos resultados do qPCR, nos interessamos em estudar mais sobre a modulação do gene *Bcl2l11* e sua correlação com o miR-295. Primeiramente confirmamos a capacidade

do ZIKV em diminuir a expressão de *Bcl2l11* (**Figura 8A**). A análise *in silico* utilizando o banco de dados *microRNA.org* mostrou que o miR-295 pode se ligar à 3'UTR de *Bcl2l11* mRNA de *Mus musculus* (seed na posição 2-8; **Figura 8B**). Para confirmar a interação entre miR-295/*Bcl2l11*, realizamos o ensaio funcional utilizando miRNAs mimetizadores. Como esperado, a administração intracerebroventricular de ZIKV ou do miR-295 mímico aumentou a expressão de miR-295 (**Figura 8C – direita**) e, conseqüentemente, diminuiu a expressão do gene *Bcl2l11* *in vivo* (**Figura 8C – esquerda**). Em seguida, confirmamos essa interação utilizando o construto pmiRGLO contendo a região do sítio de ligação de miR-295 na 3'UTR de *Bcl2l11* ou contendo *mismatch* na 3'UTR de *Bcl2l11*, chamado de mis (**Figura 8D**). A transfecção do construto pmiRGLO 3'UTR *Bcl2l11* na presença do miR-295 mímico resultou na diminuição da porcentagem de luminescência da luciferase em relação ao *scramble*, enquanto o constructo 3'UTR *Bcl2l11* mis não alterou a luminescência na presença do miR-295 mímico (**Figura 8E**). Assim, sugerimos que o ZIKV aumenta a expressão do miR-295 para diminuir a expressão de *Bcl2l11*.

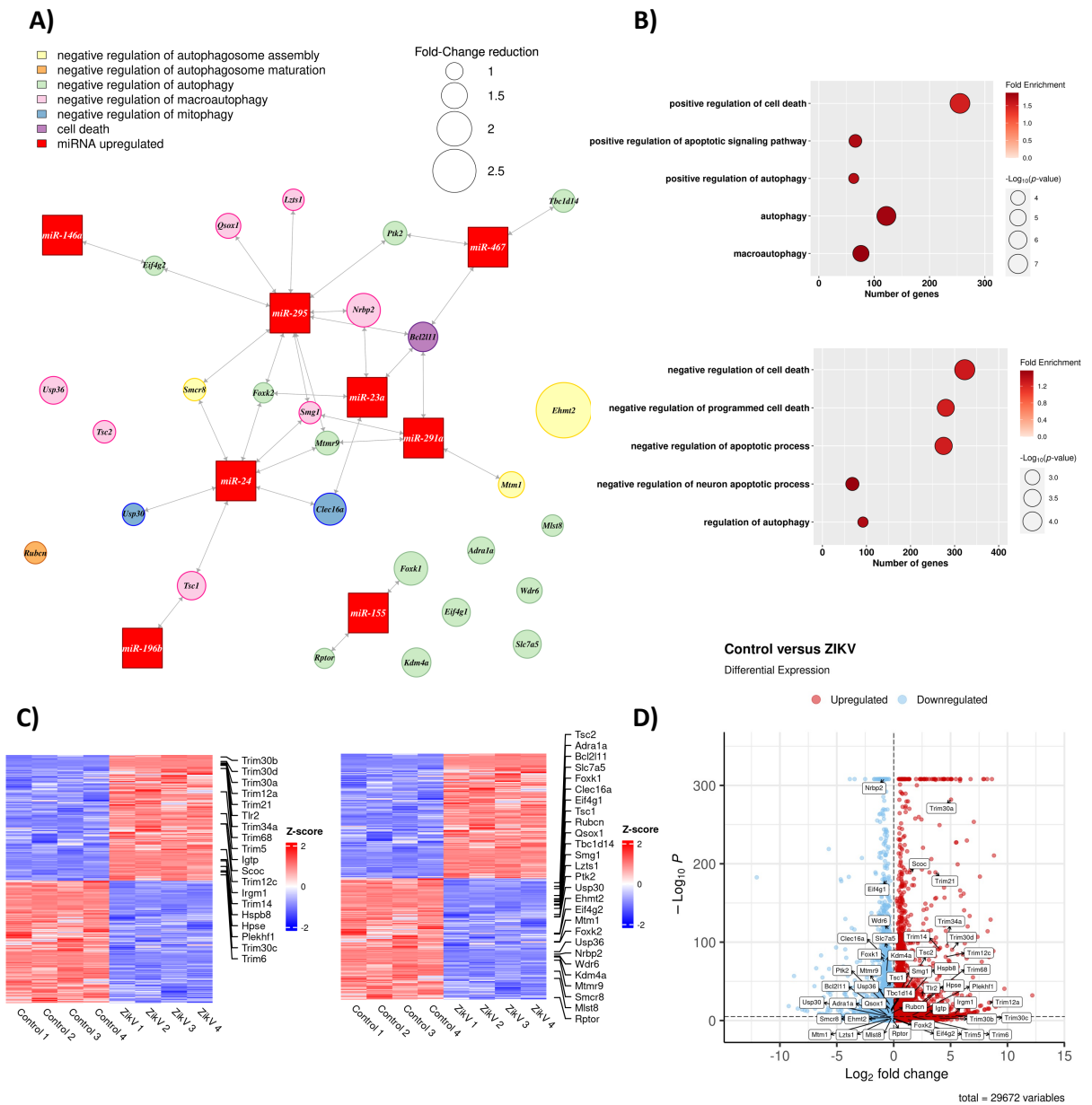


**Figura 8. ZIKV aumenta o miR-295 para regular negativamente o mRNA *Bcl2/11* no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas.** **A)** Expressão do gene *Bcl2/11* no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas. N=7; T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. **B)** Alinhamento da sequência do miR-295 e seu sítio de ligação na 3' UTR do gene *Bcl2/11* usando o banco de dados microRNA.org. **C)** Expressão gênica de *Bcl2/11* e miR-295 no cérebro total dos filhotes após administração intracerebroventricular do miR-295 mímico ou de 10<sup>5</sup> PFU de ZIKV. N=6-5; One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Comparação com o grupo *scramble*. **D)** Esquema do construto pmiRGLO. Figura criada no BioRender.com. **E)** HEK-293T foram transfectadas com pmiRGLO vazio, com o sítio de ligação do miR-295 no 3'UTR do gene *Bcl2/11* (esquerda), ou com o sítio de ligação do miR-295 no 3'UTR do gene *Bcl2/11* com alterações (direita), na presença do miR-295 mímico. Os lisados de células foram analisados quanto à atividade de luciferase. Os valores de *firefly* luciferase foram primeiramente normalizados por *renilla* luciferase, e então normalizados pelos valores obtidos com células transfectadas com o construto pmiRGLO vazio. N=5; T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo *scramble*. Representativo de três experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

#### 4.5. A infecção pelo ZIKV estimula autofagia mediada pelas interações mRNA/miRNAs.

Posteriormente, realizamos o sequenciamento de RNA (*RNA-seq*) do cérebro de filhotes nascidos de mães SJL infectadas ou não um dia após o nascimento (Bioproject NCBI – PRJNA894820). Dessa forma, procuramos genes regulados negativamente pela infecção por ZIKV que eram alvos putativos dos miRNAs aumentados, com foco nas vias de autofagia (**Figura 5A-B, 9A**). Realizamos a predição utilizando a plataforma *miRWalk 2.0*, utilizando o teste estatístico de Bonferroni e considerando os genes modulados estatisticamente com  $p < 0,05$ . Curiosamente, vários mRNAs regulados negativamente pela infecção por ZIKV estão relacionados à regulação negativa da autofagia e os mesmos são alvos preditos dos miRNAs regulados positivamente (**Figura 9A**). Mostramos também a modulação de vias relacionadas à morte celular, incluindo apoptose e autofagia (**Figura 9B**). Além disso, o RNA-seq mostrou o aumento de genes envolvidos na regulação positiva da autofagia, como genes da família dos motivos tripartidos (TRIM - do inglês, *tripartite motif*), *Igtp*, *Tlr2*, *Scoc*, *Irgm1*, *Hspb8*, *Hpse* e *Plekhf1*. Por outro lado, observamos uma supressão de genes relacionados à regulação negativa da autofagia, incluindo *Bcl2/11* (**Figura 9C-D**). Curiosamente, *Bcl2/11* também pode ser regulado por miR-23a, miR-291a, miR-295 e miR-467 (**Figura 9A**). Assim, podemos sugerir que o ZIKV desregula a rede de miRNAs para, conseqüentemente, estimular as vias de autofagia no cérebro dos filhotes SJL nascidos de mães infectadas pelo ZIKV.





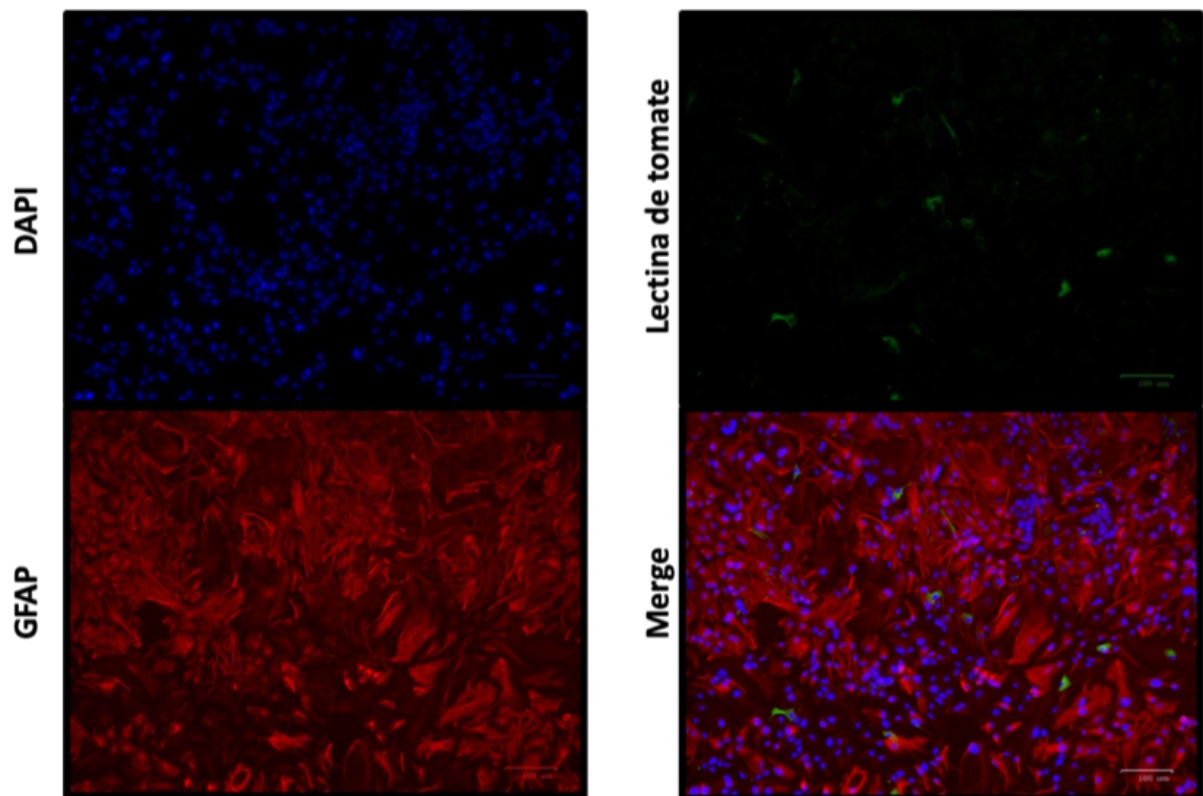
**Figura 9.** ZIKV modula o perfil de miRNAs para estimular a autofagia no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas. **A)** Interactoma dos miRNAs regulados positivamente e seus mRNAs alvos preditos regulados negativamente e relacionados à regulação negativa da autofagia no sequenciamento de RNA do cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas. **B)** Bubble plot, **C)** Heat-map, e **D)** Volcano plot do sequenciamento de RNA do cérebro de filhotes SJL nascidos de mães não infectadas ou infectadas com ZIKV.

#### 4.6. Padronização do cultivo de astrócitos primários de neonatos murinos e a capacidade do ZIKV infectá-los.

Como dito anteriormente, os astrócitos são uma população muito abundante no SNC e, curiosamente, são mais suscetíveis à infecção pelo ZIKV, pois toleram cargas virais mais altas, sofrem menos morte celular e são usados para replicação viral<sup>53,117</sup>. Além disso, os

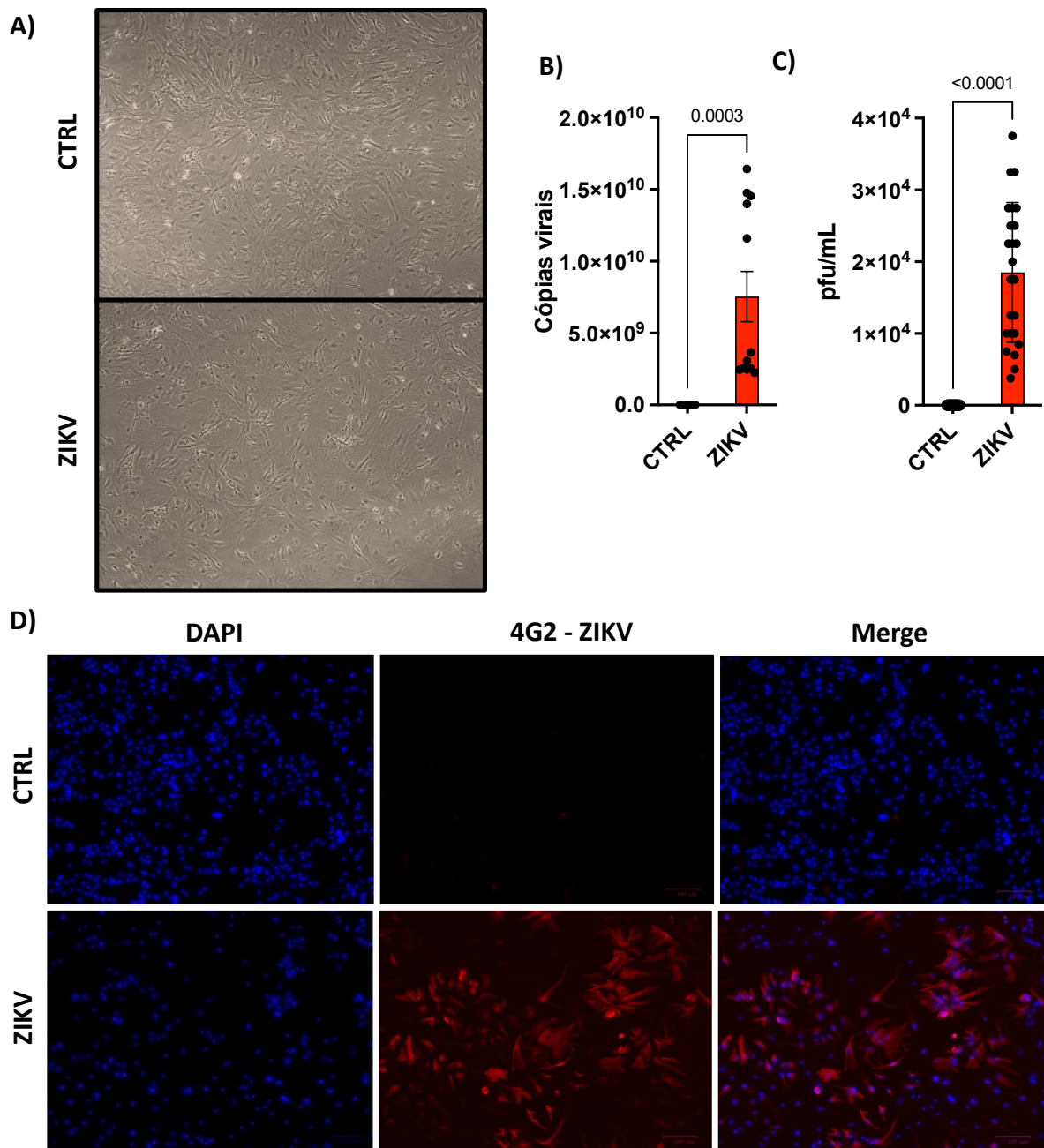
astrócitos são suporte energético para as NPCs e neurônios durante a neurogênese<sup>50,51</sup>. Dessa forma, decidimos avaliar os astrócitos durante a infecção pelo ZIKV, uma vez que apostamos que os mesmos exerçam um papel fundamental durante o desenvolvimento da microcefalia.

Por conseguinte, padronizamos o cultivo de astrócitos a partir da cultura mista primária utilizando cérebro de animais SJL de 1 a 3 dias de vida. Para tanto, retiramos a meninge e o cerebelo do cérebro dos neonatos, processamos o tecido restante e cultivamos por aproximadamente 15 dias conforme descrito nos materiais e métodos. Posteriormente, realizamos a separação de astrócitos e micróglia e demonstramos o enriquecimento da cultura de astrócitos por imunofluorescência (**Figura 10**) marcando os astrócitos com anti-GFAP em vermelho e a micróglia com lectina de tomate em verde.



**Figura 10. Pureza da cultura de astrócitos primários de neonatos de SJL.** A partir do cérebro de neonatos de SJL com no máximo 3 dias de vida, realizamos a cultura mista de astrócitos e micróglia. Após 15 dias de cultivo os astrócitos foram separados da micróglia e observamos a pureza da cultura por imunofluorescência marcando astrócitos em vermelho (anti-GFAP), a micróglia em verde (Lectina de tomate), DAPI em azul e o merge das imagens. Fotos no aumento de 20X.

Ao realizarmos a infecção dos astrócitos enriquecidos, demonstramos que o ZIKV não é capaz de alterar a morfologia dos astrócitos (**Figura 11A**), embora seja capaz de infectá-los, uma vez que observamos a presença de RNA viral (**Figura 11B**), partículas virais infectantes (**Figura 11C**) e presença do envelope viral (**Figura 11D**).

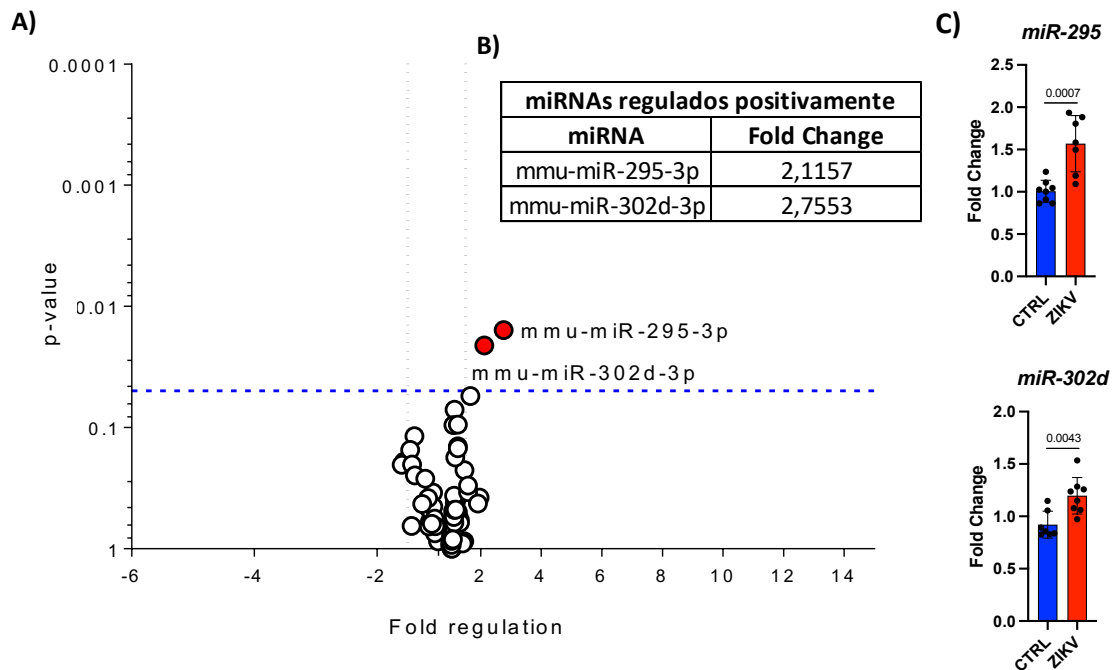


**Figura 11. ZIKV é capaz de infectar astrócitos primários de neonatos de SJL.** A partir do cérebro de neonatos de SJL com no máximo 3 dias de vida, realizamos a cultura mista de astrócitos e micrógliia. Após 15 dias de cultivo os astrócitos foram separados da micrógliia e **A)** infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h da infecção, os astrócitos **B)** tiveram seu RNA extraído para análise do número de cópias virais por qPCR (N=12) e **C)** com o sobrenadante foi realizado PFU (N=24). T-test, media e desvio padrão. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Em **D)** foi comprovada a infecção pelo ZIKV por imunofluorescência (N=3), fotos no aumento de 20X.

#### 4.7. ZIKV é capaz de modular o perfil de miRNAs para favorecer a autofagia em astrócitos primários de neonatos de SJL.

Ao compararmos o perfil de miRNAs nos astrócitos primários de neonatos de SJL infectados ou não com ZIKV (**Figura 12A**), observamos dois miRNAs regulados positivamente

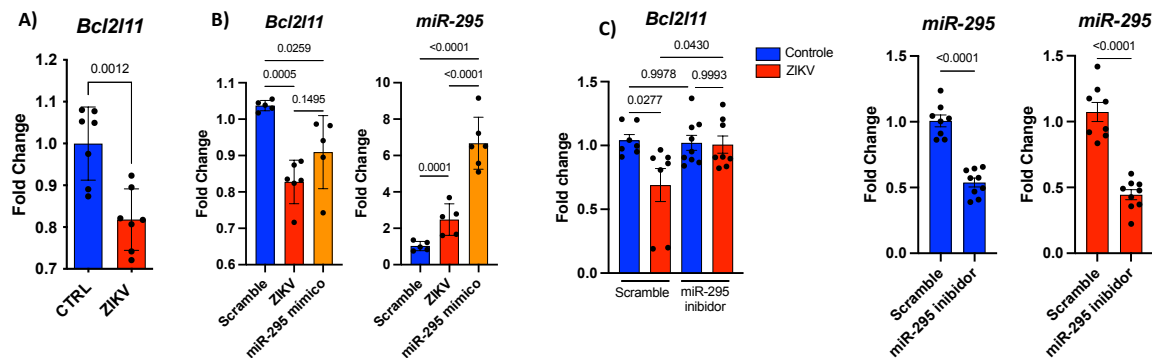
pelo ZIKV, sendo eles, o miR-295 e o miR-302d (**Figura 12B**). O aumento da expressão desses dois miRNAs foi confirmada por qPCR (**Figura 12C**).



**Figura 12. miRNAs regulados pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL.** A partir do cérebro de neonatos de SJL com no máximo 3 dias de vida, realizamos a cultura mista de astrócitos e micrógliia. Após 15 dias de cultivo os astrócitos foram separados da micrógliia e infectados (MOI=1, N=3). Após 72h de infecção, os astrócitos foram coletados e submetidos ao protocolo para análise miRNAs utilizando o miScript miRNA PCR Array miFinder (Qiagen – Mouse MIMM-001Z). **A)** Volcano Plot, sendo os pontos brancos os inalterados e os pontos em vermelho regulados positivamente. **B)** Tabela dos miRNAs regulados positivamente. Cada placa representa um pool das amostras (N=3) de cada experimento independente. Linha tracejada preta representa a delimitação de Fold Change de 2, e a linha tracejada azul representa p=0,05. **C)** Os astrócitos murinos de SJL infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h de infecção, os astrócitos foram coletados e seu mRNA extraído para validação por qPCR da expressão dos miR-295 (em cima) e miR-302d (embaixo). N=7-8. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Representativo de três experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

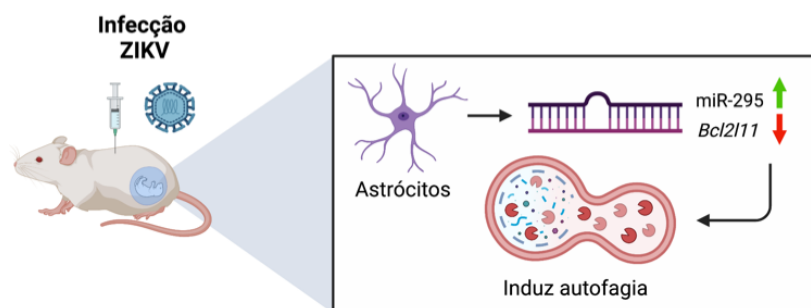
Como visto no cérebro dos filhotes nascidos de mães infectadas, observamos um aumento do miR-295 e por ter já sido demonstrado que a infecção por ZIKV aumenta a expressão de LC3-II em astrócitos, indicando ativação da via de autofagia<sup>118</sup>, decidimos avaliar a interação de miR-295 e *Bcl2l11* em astrócitos. Após 72 h de infecção, o ZIKV diminuiu a expressão gênica de *Bcl2l11* (**Figura 13A**), enquanto aumentou a expressão do miR-295 (**Figura 12C**) em astrócitos *in vitro*. Em seguida, realizamos ensaios funcionais para comprovar a interação miR-295 e *Bcl2l11* em astrócitos. Dessa forma, observamos que o inibidor de miR-295 diminuiu, enquanto o miR-295 mímico aumentou sua expressão em astrócitos infectados

ou não infectados, validando o ensaio (Figura 13B-C - direita). Por outro lado, o inibidor de miR-295 aumentou (Figura 13C - esquerda), enquanto o miR-295 mímico diminuiu a expressão de *Bcl2/11* (Figura 13B - esquerda).



**Figura 13. ZIKV aumenta miR-295 para regular negativamente o mRNA *Bcl2/11* em astrócitos primários de neonatos de SJL.** Os astrócitos murinos de SJL infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h de infecção, os astrócitos foram coletados e seu mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica de **A) *Bcl2/11***. N=7; T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Expressão dos genes *Bcl2/11* (esquerda) e miR-295 (direita) em astrócitos, na presença do **B) miR-295 mímico** e **C) miR-295 inibidor**. N=5-9; One-Way ANOVA ou Two-way ANOVA, média e desvio padrão. Comparação com o grupo *scramble*. Representativo de três experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Juntos, esses dados evidenciam a capacidade do ZIKV em aumentar o miR-295 para limitar a expressão de *Bcl2/11* em astrócitos *in vitro* e no cérebro total de filhotes. Dessa forma, sugerimos que o ZIKV desregula o perfil de miRNAs para consequentemente estimular a autofagia (Figura 14).



**Figura 14. ZIKV aumenta miR-295 para regular negativamente o mRNA *Bcl2/11* durante sua transmissão vertical e em astrócitos de camundongos SJL.** Figura criada no BioRender.com

#### 4.8. Predição dos genes modulados pelos miRNAs regulados pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL.

Apesar de termos demonstrado a interação entre o miR-295 e o gene *Bcl2l11*, o miR-295 e o miR-302d também possuem outros alvos interessantes. Com isso, novamente utilizamos de ferramentas computacionais para prever os alvos dos miRNAs regulados que estejam relacionados com a resposta imune e neurodesenvolvimento.

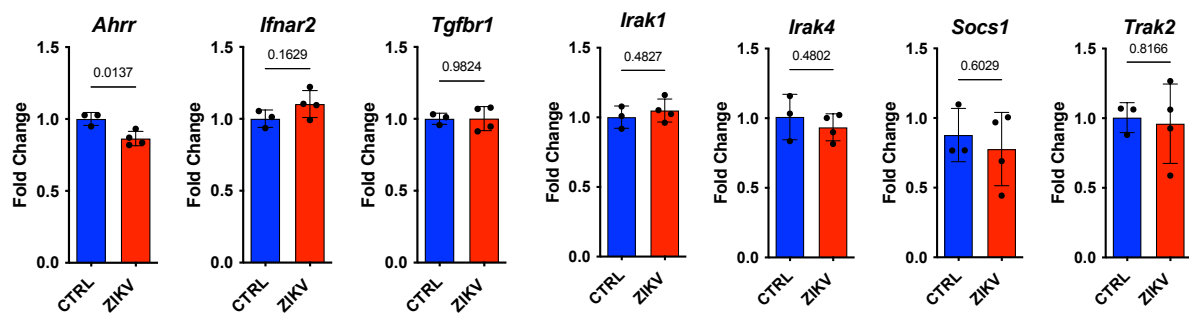
Nossos resultados demonstraram que os miRNAs que foram regulados positivamente têm como alvos preditos diversos genes envolvidos em respostas pró-inflamatórias (**Tabela 6**). Genes relacionados às citocinas, como do receptor da IFN-λ e o indutor da citocina TNF-α (*Tnfaip8*) são possíveis alvos. Além desses, podemos destacar: 1) As MAP quinases, como, a *Mapk9*; 2) Os genes de sinalização celular e fatores de transcrição, como *Nfatc1*, *Nfatc3*, *Irf2* e *Ilf3*; 3) Genes de diferenciação neuronal, como, *Neurod4* e *Neurod6*; 4) o repressor da sinalização do receptor de aril hidrocarboneto (*Ahrr*); e 5) o *Bcl2l11*, como demonstrado anteriormente.

miRNA	Gene	Função/Características
mmu-miR-295-3p	<i>Ahrr</i>	Repressor da sinalização do receptor de aril hidrocarboneto
	<i>Neurod6</i>	Pertence à família de fatores de diferenciação neuronal
	<i>Neurod4</i>	Pertence à família de fatores de diferenciação neuronal
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica
	<i>Ifnlr1</i>	Receptor de Interferon Lambda
	<i>Mapk9</i>	MAP quinase envolvida em vários processos celulares, como proliferação, diferenciação, regulação da transcrição e desenvolvimento
	<i>Tnfaip8</i>	Indutor da citocina TNF-α
	<i>Nfatc1</i>	Fator de transcrição de linfócitos T ativados
mmu-miR-302d-3p	<i>Ahrr</i>	Repressor da sinalização do receptor de aril hidrocarboneto
	<i>Neurod6</i>	Pertence à família de fatores de diferenciação neuronal
	<i>Neurod4</i>	Pertence à família de fatores de diferenciação neuronal
	<i>Bcl2l11</i>	Função anti-autofágica
	<i>Nfatc3</i>	Fator de transcrição de linfócitos T ativados
	<i>Irf2</i>	Fator de transcrição da regulação interferon
	<i>Ilf3</i>	Regulação pós-transcricional da expressão gênica

**Tabela 7.** Genes alvos preditos dos miRNAs regulados positivamente pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL.

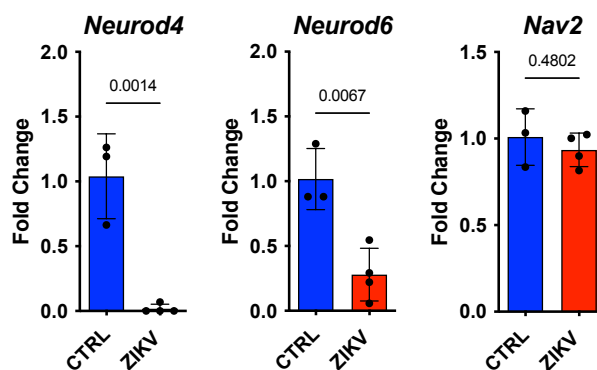
#### 4.9. Avaliação da expressão do mRNA alvos dos miRNAs regulados pelo ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL.

Em seguida avaliamos a expressão dos mRNA alvos preditos dos miRNAs regulados e separamos em genes relacionados a resposta imune e neurodesenvolvimento. Ao avaliarmos os genes envolvidos na resposta imune, observamos que o miR-295 e miR-302d, que estão regulados positivamente, tem como alvo o *Ahrr*, o qual teve sua expressão diminuída nos astrócitos infectados com ZIKV, enquanto todos os outros genes avaliados não sofreram alteração (Figura 15).



**Figura 15.** Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV envolvidos na resposta imune antiviral em astrócitos primários de neonatos de SJL. Os astrócitos murinos de SJL infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h de infecção, os astrócitos foram coletados e seu mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica de alvos envolvidos com a resposta imune antiviral (N=3-4). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Quando nos atentamos aos genes envolvidos com o neurodesenvolvimento, observamos a diminuição significativa de *Neurod4* e *Neurod6*, que são moléculas produzidas pelos astrócitos para auxiliar na neurogênese e diferenciação neuronal<sup>119,120</sup>, enquanto que não houve alteração na expressão de *Nav2* (Figura 16). Portanto, os genes *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* são alterados pelo ZIKV em astrócitos de SJL.



**Figura 16.** Expressão gênica dos alvos dos miRNAs modulados pelo ZIKV relacionados com neurodesenvolvimento em astrócitos primários de neonatos de SJL. Os astrócitos murinos de SJL

infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h de infecção, os astrócitos foram coletados e seu mRNA extraído para posterior análise de expressão gênica de alvos envolvidos com o neurodesenvolvimento (N=3-4). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

#### 4.10. ZIKV aumenta a expressão de miR-295 e miR-302d para reprimir *Ahrr* e estimular a via de AHR.

Como demonstrado anteriormente, o gene *Ahrr* teve sua expressão diminuída tanto no cérebro dos filhotes nascidos de mães infectadas (Figura 6), quanto nos astrócitos de SJL (Figura 15). É importante citar que o *Ahrr* é um gene alvo do miR-295 aumentado no cérebro total e em astrócitos, e também do miR-302d, aumentado nos astrócitos. Dessa forma, realizamos ensaios funcionais para comprovar a interação entre miR-295/miR-302d com o mRNA de *Ahrr* e, assim, investigar sua importância na patogênese da microcefalia causada pelo ZIKV.

Primeiramente confirmamos que o ZIKV é capaz de diminuir a expressão do gene *Ahrr* *in vitro* (Figura 15, 17A) e *in vivo* (Figura 6). Ao utilizarmos os inibidores dos miR-295 e miR-302d esse efeito foi revertido e não observamos mais essa diferença entre o grupo controle e o ZIKV tanto para o gene *Ahrr* (Figura 17A) quanto para a proteína AhRR avaliada pela média de intensidade de fluorescência (MFI) por citometria de fluxo em astrócitos infectados com ZIKV *in vitro* (Figura 17B-C). Além disso, ao compararmos o scramble com o grupo dos miRNAs inibidos durante a infecção pelo ZIKV, observamos um aumento da expressão do *Ahrr* (Figura 17A). A análise *in silico* utilizando o banco de dados microRNA.org mostrou que o miR-295 e o miR-302d podem se ligar à 3'UTR de *Ahrr* mRNA de *Mus musculus* (Figura 17D).

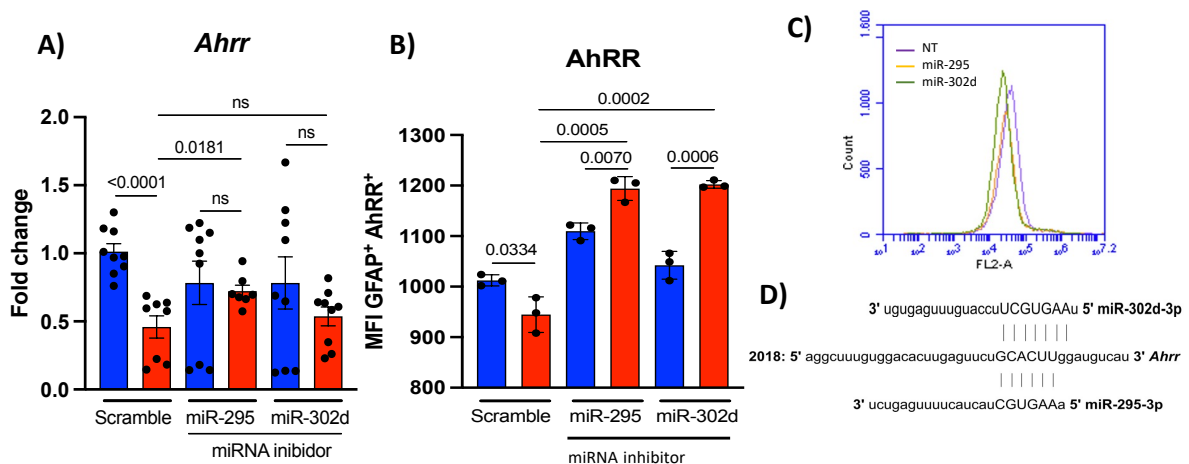
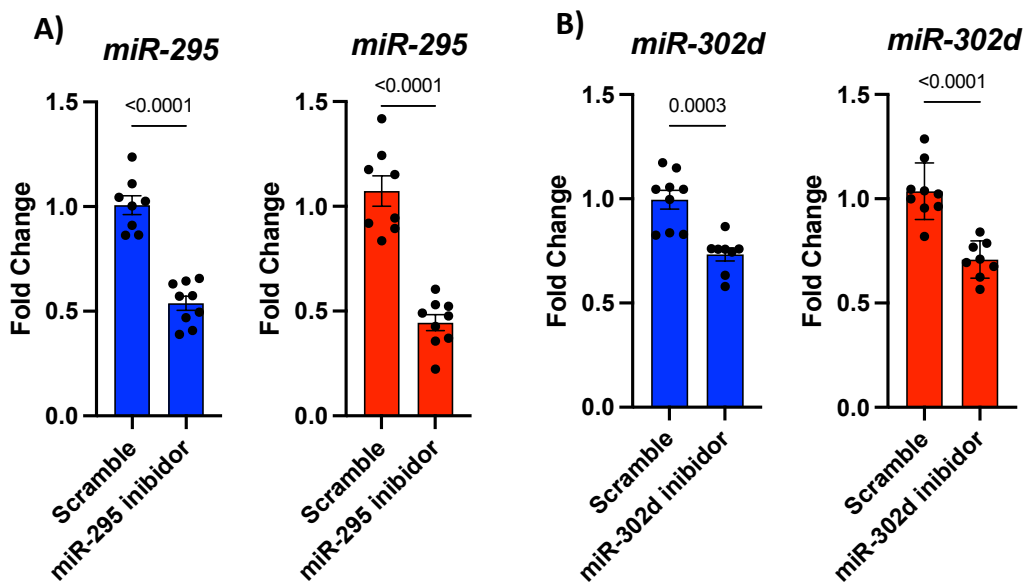


Figura 17. Os miR-295 e miR-302d inibidores aumentam a expressão do mRNA *Ahrr* em astrócitos primários de neonatos de SJL. Os astrócitos de SJL foram semeados para realização da transfecção do



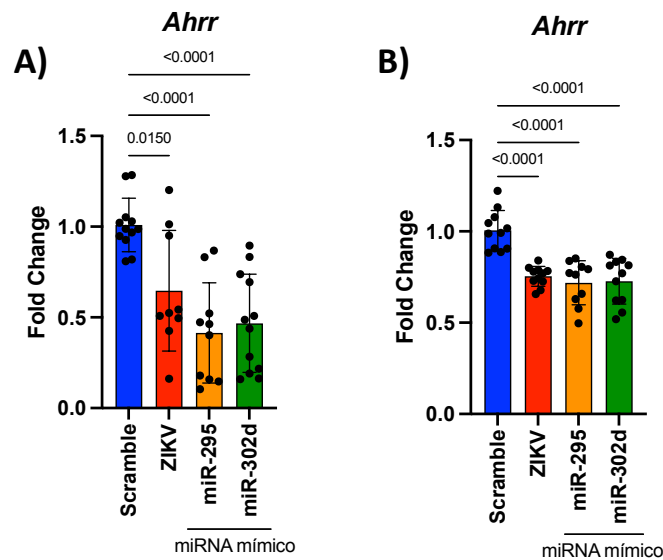
miR-295 ou miR-302d inibidor. Após 24h, as células foram infectadas ou não com ZIKV (MOI=1, N=7-9) durante 72h. Em seguida, foi avaliada a **A)** expressão gênica (N=7-9), **B)** MFI (N=3) e **C)** histograma de AhRR. **D)** Região *seed* de ligação do AhRR com miR-295 e miR-302d. Comparação com o grupo controle scramble. Two-way ANOVA, média e desvio padrão. Representativo de três experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

A inibição dos miRNAs foi validada por qPCR, uma vez que diminui a expressão dos miR-295 (**Figura 18A**) e miR-302d (**Figura 18B**) com o uso dos inibidores na ausência ou presença da infecção pelo ZIKV.



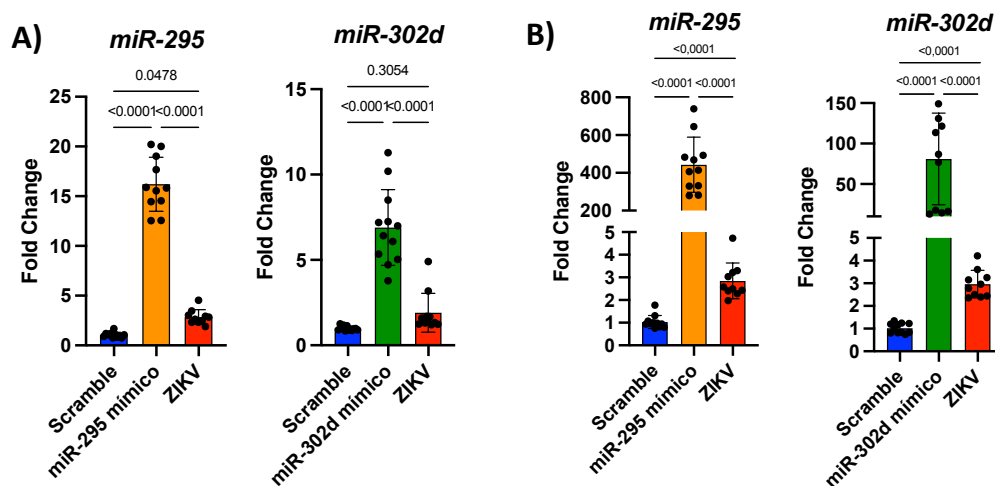
**Figura 18. Validação da inibição dos miRNAs.** Os astrócitos de SJL foram semeados para realização da transfecção dos miRNAs inibidores **A)** miR-295 e **B)** miR-302d. Após 24h, as células foram infectadas ou não com ZIKV (MOI=1, N=8-9) durante 72h. Em seguida foram coletadas e tiveram seu o mRNA extraído para posterior confirmação da diminuição da expressão dos miR-295 e miR-302. Os dados foram normalizados com o miRNA endógeno SNORD68 e comparados com o grupo scramble. T test, média e desvio padrão. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Como esperado, quando utilizamos os miRNAs mímicos ou infectamos com ZIKV, observamos a diminuição da expressão de *Ahrr*, tanto *in vitro* (**Figura 19A**), quanto *in vivo* (**Figura 19B**).



**Figura 19. Os miR-295 e miR-302d mímicos diminuem a expressão do mRNA *Ahrr*.** Expressão gênica do *Ahrr* após uso dos miRNAs mímicos **A)** *in vitro* (N=12) e **B)** *in vivo* (N=11) ou após infecção pelo ZIKV. *In vitro* MOI=1 e *in vivo*  $10^5$  PFU intracerebroventricular. Comparação com o grupo *scramble*. One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

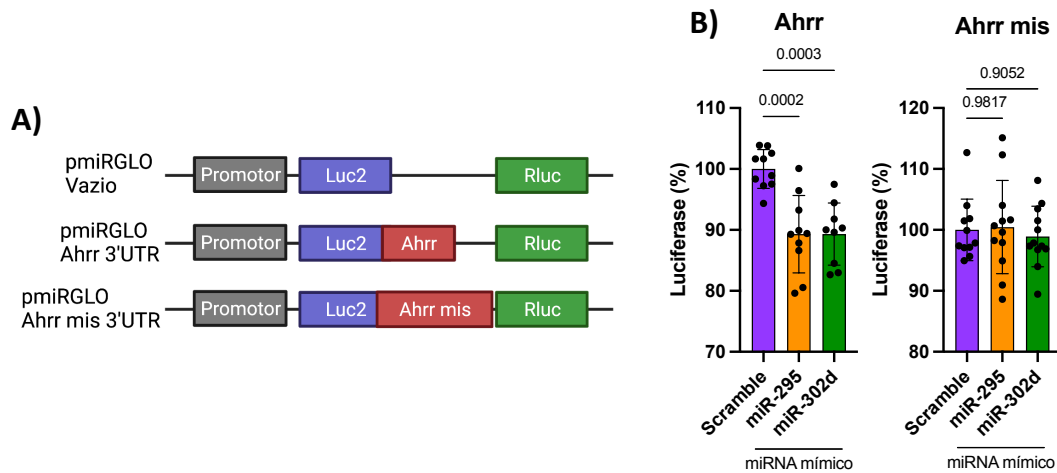
A mimetização dos miRNAs foi validada por qPCR, uma vez que aumentou a expressão dos miR-295 (Figura 20A) e miR-302d (Figura 20B).



**Figura 20. Validação do uso dos miRNAs mímicos.** Expressão gênica dos miR-295 e miR-302d após uso dos miRNAs mímicos **A)** *in vitro* (N=12) e **B)** *in vivo* (N=11) ou após infecção pelo ZIKV. *In vitro* MOI=1 e *in vivo*  $10^5$  PFU intracerebroventricular. Comparação com o grupo *scramble*. One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

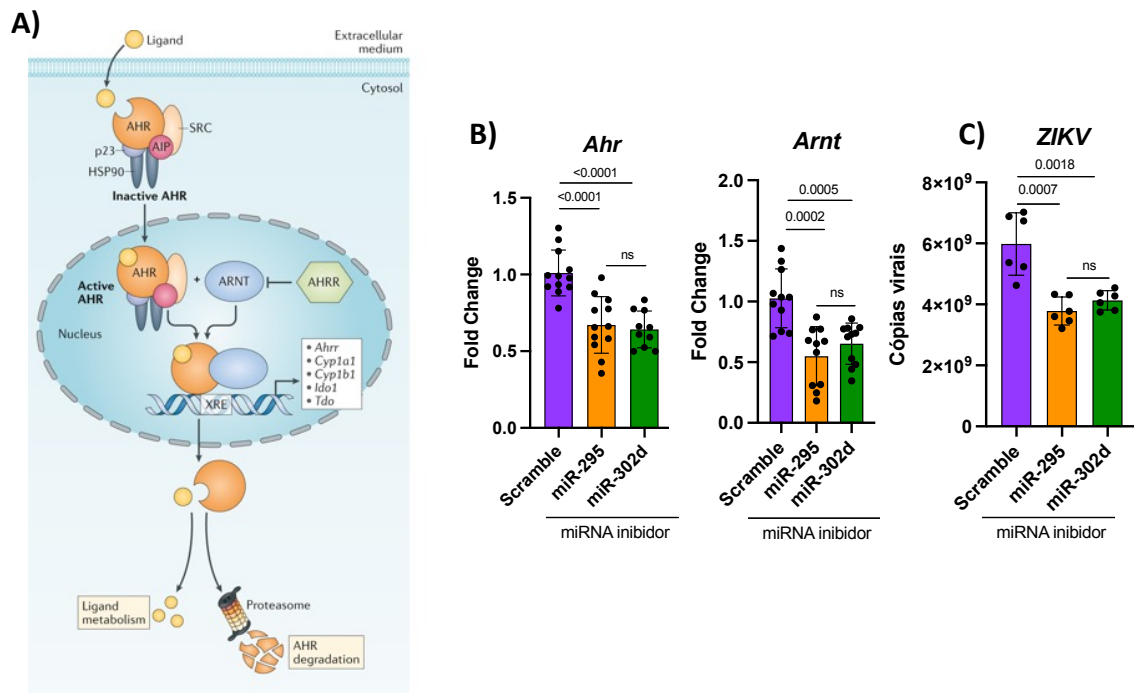
Curiosamente, o *cluster* miR-290-295 compartilha a mesma sequência *seed* do cluster miR-302-367<sup>121</sup>. Portanto, o sítio de ligação do miR-295 e do miR-302d no gene *Ahrr* é o mesmo (Figura 17D). Dessa forma, confirmamos a interação miRNA-mRNA utilizando o

construto pmiRGLO contendo a região do sítio de ligação de miR-295/miR-302d na 3'UTR de *Ahrr* ou contendo *mismatch* na 3'UTR de *Ahrr* (**Figura 21A**). A transfecção do construto pmiRGLO 3'UTR *Ahrr* na presença do miR-295 ou miR-302d mímico resultou na diminuição da porcentagem de luminescência da luciferase em relação ao *scramble*, enquanto o constructo 3'UTR *Ahrr* mis não alterou a luminescência na presença do miR-295 ou miR-302d mímico (**Figura 21B**).



**Figura 21. Os miR-295 e miR-302 regulam negativamente o mRNA *Ahrr*.** **A)** Esquema do construto pmiRGLO. Figura criada no BioRender.com. **B)** HEK-293T foram transfectadas com pmiRGLO vazio, com o sítio de ligação do miR-295 ou miR-302d no 3'UTR do gene *Ahrr* (esquerda), ou com o sítio de ligação do miR-295 e miR-302d no 3'UTR do gene *Ahrr* com alterações (direita), na presença dos miRNAs mímico. Os lisados de células foram analisados quanto à atividade de luciferase. Os valores de *firefly* luciferase foram primeiramente normalizados por *renilla* luciferase, e então normalizados pelos valores obtidos com células transfectadas com o construto pmiRGLO vazio. N=10-12; One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Comparação com o grupo *scramble*. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

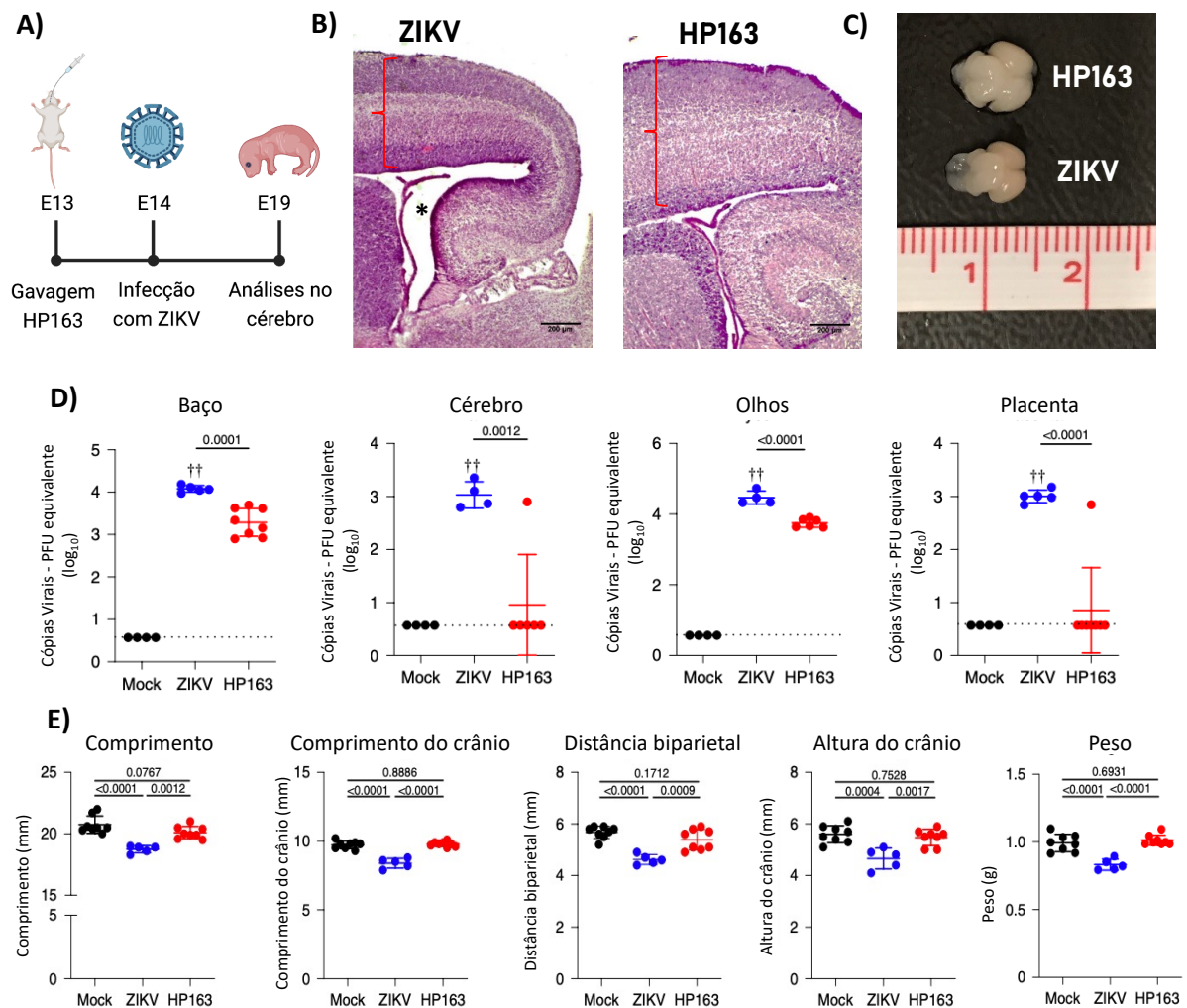
O AHR é membro da superfamília de fatores de transcrição Pern-Arnt-Sim (PAS) que é ativado por pequenas moléculas que são fornecidas pela dieta, microorganismos, metabolismo e poluentes. Em resposta a ativação por um ligante, o AHR transloca-se do citoplasma para o núcleo e se dimeriza com a molécula ARNT, onde juntos irão controlar a transcrição de uma ampla variedade de genes, incluindo *Cyp1a1* e *Cyp1b1*. A molécula AhRR é capaz de dimerizar com o ARNT e impedir que o mesmo se ligue ao AHR, reprimindo essa sinalização (**Figura 22A**)<sup>122</sup>. Dessa forma, decidimos avaliar a expressão dos genes *Ahr* e *Arnt*. Nós observamos que a inibição dos miR-295 e miR-302d levou ao aumento do *Ahrr* que, conseqüentemente diminuiu a expressão de *Arnt* e *Ahr* (**Figura 22B**). Curiosamente, a inibição desses miRNAs levou a diminuição do número de cópias virais do ZIKV (**Figura 22C**).



**Figura 22. Os miR-295 e miR-302d inibidores diminuem a ativação de AHR em astrócitos primários de neonatos de SJL. A)** Via de sinalização do AhR e bloqueio da mesma por AhRR<sup>122</sup>. Análise da expressão gênica de **B)** *Ahr*, *Arnt* e **C)** cópias virais do ZIKV por qPCR após 72 h de infecção e uso dos inibidores dos miR-295 ou miR-302d ou scramble (N=6-12). Comparação com o grupo scramble infectado. One-Way ANOVA, média e desvio. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Portanto, podemos sugerir que ZIKV aumenta a expressão dos miR-295 e miR-302d levando a diminuição do *Ahrr* e, conseqüentemente, ao aumento da expressão de *Arnt* e *Ahr* para favorecer sua replicação viral. Sabendo que o ZIKV induz o aumento de AHR, decidimos avaliar se a inibição de AHR fornecia proteção durante sua transmissão vertical causada pela infecção com ZIKV. Para tanto, tratamos ou não fêmeas SJL prenhes a partir de E13 até E19 com o inibidor de AHR, conhecido como HP163, por gavagem a cada 12 h. Em E14 infectamos as fêmeas prenhes com  $10^3$  PFU por via subcutânea e analisamos os fetos em E19 (**Figura 23A**). Nós pudemos observar que a inibição do AHR foi capaz de prevenir a perda de peso e permitir que medidas como, comprimento do corpo, comprimento e altura da cabeça e distância biparietal dos neonatos fossem semelhantes aos animais não infectados (**Figura 23E**). Ademais, observamos que o tratamento com HP163 foi capaz de diminuir o ventrículo cerebral dos fetos e aumentar sua camada cortical (**Figura 23B**), além de aumentar o tamanho total do cérebro (**Figura 23C**). O tratamento também diminuiu o número de cópias virais no baço, cérebro, olhos e placenta (**Figura 23D**). Sendo assim, conseguimos mostrar que a

inibição do AHR é capaz de diminuir a infecção vertical e replicação do ZIKV, o que pode aliviar, principalmente, em futuros estudos com foco em intervenção terapêutica.



**Figura 23. A inibição do AHR reduz a patologia causada pela infecção do ZIKV em neonatos nascidos de mães infectadas. A)** SJL prenhes foram tratadas ou não com HP163 (50 mg/kg) duas vezes por dia do E13-E19. Em E14 as fêmeas foram infectadas ou não com 10<sup>3</sup> PFU de ZIKV. Em E19 os animais foram eutanasiados e os fetos analisados. Figura criada no BioRender.com **B)** Histologia do cérebro dos neonatos: ZIKV (painel da esquerda) e ZIKV + HP163 (painel da direita). **C)** Figura representativa dos cérebros dos filhotes. **D)** Cópias virais para o genoma do ZIKV no baço, cérebro, olhos e placenta de neonatos nascidos de mães infectadas e previamente tratadas ou não com HP163. **E)** Medidas da cabeça e do corpo dos neonatos nascidos de mães infectadas e previamente tratadas ou não com HP163. (N=5-8). Comparação com o grupo mock. One-Way ANOVA, média e desvio. Representativo de três experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ . † morte fetal.

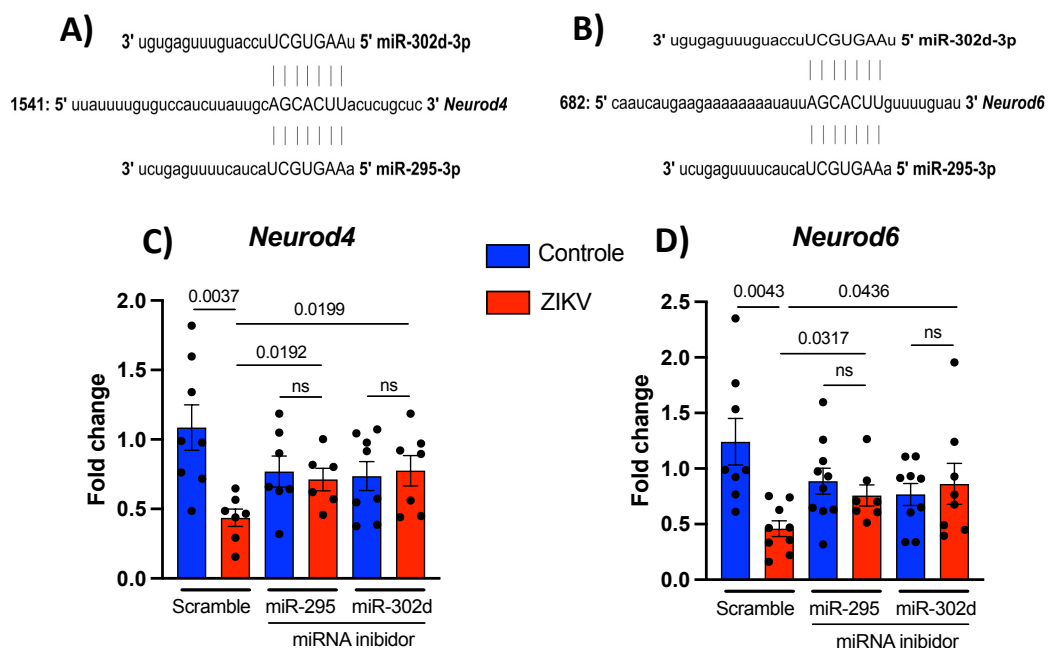
#### 4.11. ZIKV aumenta a expressão de miR-295 e miR-302d para diminuir os genes *Neurod4* e *Neurod6* e, conseqüentemente, o neurodesenvolvimento.

Nossos resultados também demonstraram que os miR-295 e miR-302d podem inibir fatores de diferenciação neuronal, como NeuroD4 e NeuroD6, moléculas que são produzidas pelos astrócitos para induzir reprogramação neuronal<sup>119</sup> e que regulam a atividade pro neural

e, conseqüentemente, estimulam a neurogênese<sup>120</sup>. Sendo assim, a ausência dessas moléculas auxilia no desenvolvimento das lesões observadas durante a infecção pelo ZIKV.

Embora a expressão gênica de *Neurod4* e *Neurod6* não se altere no cérebro total de filhotes nascidos de mães infectadas (Figura 7A), sua expressão foi drasticamente diminuída pela infecção com ZIKV em astrócitos primários de neonatos de SJL (Figura 16). Dessa forma, decidimos avaliar a interação entre os miR-295/miR-302d com os genes *Neurod4* e *Neurod6* que também possuem a mesma sequência *seed*.

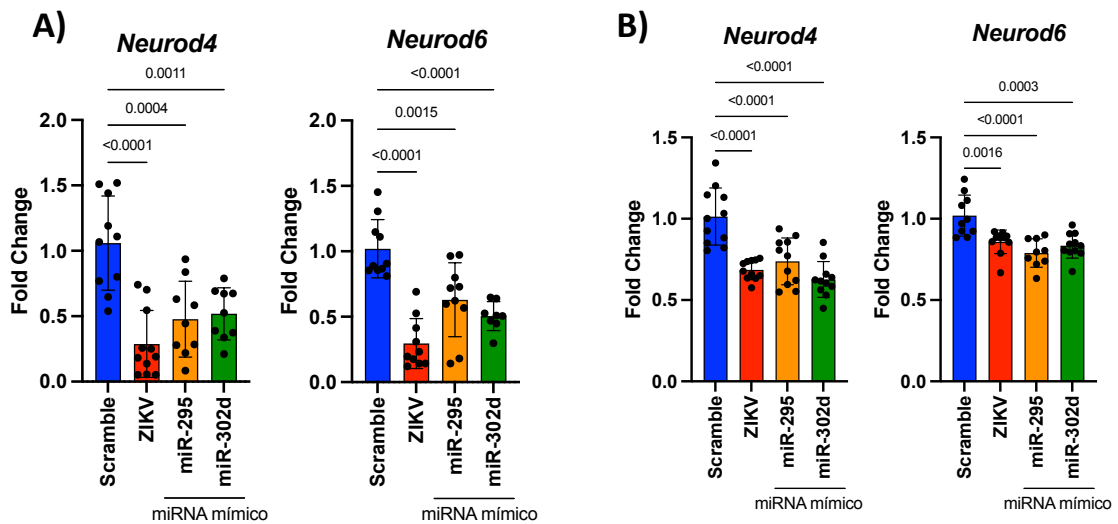
Primeiramente, as análises *in silico* utilizando o banco de dados *microRNA.org* mostrou que os miR-295 e miR-302d podem se ligar à região 3'UTR de *Neurod4* (Figura 24A) e *Neurod6* (Figura 24B) do mRNA de *Mus musculus*. Em seguida, confirmamos que o ZIKV é capaz de diminuir a expressão desses genes *in vitro* (Figura 24C-D). Ao utilizarmos os inibidores dos miR-295 e miR-302d esse efeito foi revertido e não observamos mais essa diferença entre o grupo controle e o ZIKV (Figura 24C-D). Além disso, ao compararmos o *scramble* com o grupo dos miRNAs inibidos durante a infecção pelo ZIKV, observamos um aumento da expressão de *Neurod4* (Figura 24C) e *Neurod6* (Figura 24D). A inibição dos miRNAs já havia sido confirmada anteriormente (Figura 18A-B).



**Figura 24. Os miR-295 e miR-302d inibidores aumentam a expressão dos mRNAs *Neurod4* e *Neurod6* em astrócitos primários de neonatos de SJL. Região *seed* de ligação do A) *Neurod4* e B) *Neurod6* com miR-295 e miR-302d. Os astrócitos de SJL foram semeados para realização da transfecção do miR-295 ou miR-302d inibidor. Após 24h, as células foram infectadas ou não com ZIKV (MOI=1, N=7-9) durante 72h. Em seguida, foi avaliada a expressão gênica de C) *Neurod4* e D) *Neurod6* (N=7-9) Comparação**

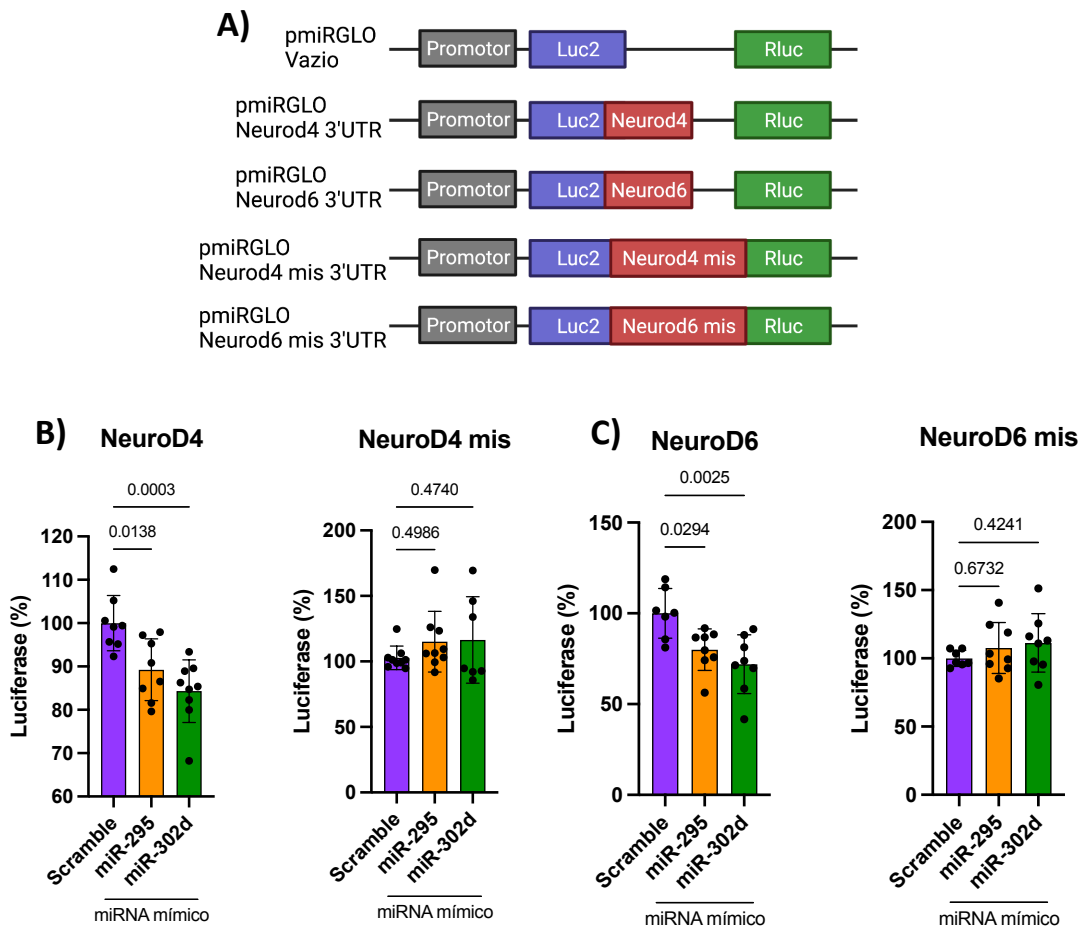
com o grupo controle *scramble*. Two-way ANOVA, média e desvio padrão. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Por sua vez, o uso dos miRNAs mímicos ou a infecção pelo ZIKV foi capaz de diminuir a expressão de *Neurod4* e *Neurod6*, tanto *in vitro* (Figura 25A), quanto *in vivo* (Figura 25B). A validação do ensaio com os miRNAs mímicos também já havia sido confirmada (Figura 20A-B).



**Figura 25. Os miR-295 e miR-302d mímicos diminuem a expressão dos mRNAs *Neurod4* e *Neurod6*.** Expressão gênica do *Neurod4* e *Neurod6* após uso dos miRNAs mímicos A) *in vitro* (N=10-12) e B) *in vivo* (N=11) ou após infecção pelo ZIKV. *In vitro* MOI=1 e *in vivo*  $10^5$  PFU intracerebroventricular. Comparação com o grupo *scramble*. One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Como dito anteriormente, o sítio de ligação do miR-295 e do miR-302d no gene *Neurod4* (Figura 24A) e no *Neurod6* (Figura 24B) é o mesmo. Dessa forma, confirmamos essa interação utilizando o construto pmiRGLO contendo a região do sítio de ligação de miR-295/miR-302d na região 3'UTR de *Neurod4* ou *Neurod6*, ou contendo *mismatch* na 3'UTR de *Neurod4* ou *Neurod6* (Figura 26A). A transfecção do construto pmiRGLO 3'UTR *Neurod4* e o *Neurod6* na presença do miR-295 ou miR-302d mímico resultou na diminuição da porcentagem de luminescência da luciferase em relação ao *scramble* (Figura 26B-C - esquerda), enquanto o constructo 3'UTR *Neurod4* mis e o *Neurod6* mis não alteraram a luminescência na presença do miR-295 ou miR-302d mímico (Figura 26B-C - direita). Assim, confirmamos que o ZIKV utiliza também os miR-295 e miR-302d para diminuir genes envolvidos com o neurodesenvolvimento, auxiliando nas lesões observadas durante a transmissão vertical do ZIKV.



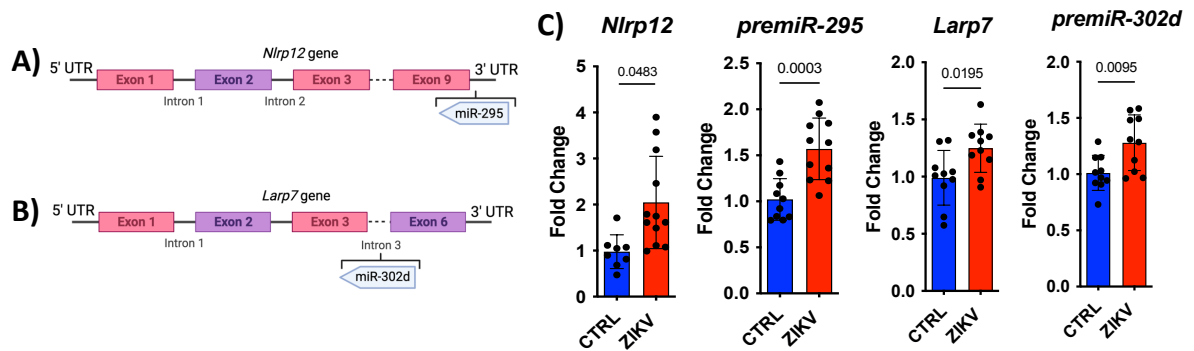
**Figura 26. Os miR-295 e miR-302 regulam negativamente os mRNAs *Neurod4* e *Neurod6*.** **A)** Esquema do construto pmirGLO. Figura criada no BioRender.com. HEK-293T foram transfectadas com pmirGLO vazio, com o sítio de ligação do miR-295 ou miR-302d na região **B)** 3'UTR do gene *Neurod4* ou **C)** *Neurod6* (esquerda), ou com o sítio de ligação do miR-295 e miR-302d no **B)** 3'UTR do gene *Neurod4* ou **C)** *Neurod6* com alterações (direita), na presença dos miRNAs mímicos. Os lisados de células foram analisados quanto à atividade de luciferase. Os valores de *firefly* luciferase foram primeiramente normalizados por *renilla* luciferase, e então normalizados pelos valores obtidos com células transfectadas com o construto pmirGLO vazio. N=10-12; One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Comparação com o grupo *scramble*. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

#### 4.12. ZIKV promove a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente, dos miR-295 e miR-302, respectivamente.

Utilizando a plataforma NCBI, descobrimos que a família do miR-295 é codificada na fita antisense na posição referente ao último íntron do gene *Nlrp12*<sup>123</sup> (**Figura 27A**), enquanto que a família do miR-302d é codificado na fita antisense na posição referente do íntron 3 do gene *Larp7*<sup>124</sup> (**Figura 27B**). Portanto, quando os genes *Nlrp12* e *Larp7* são transcritos, conseqüentemente os miR-295 e miR-302d também serão, respectivamente. E, como dito anteriormente, resumidamente os miRNAs são processados em pri-miRNA por DROSHA, em



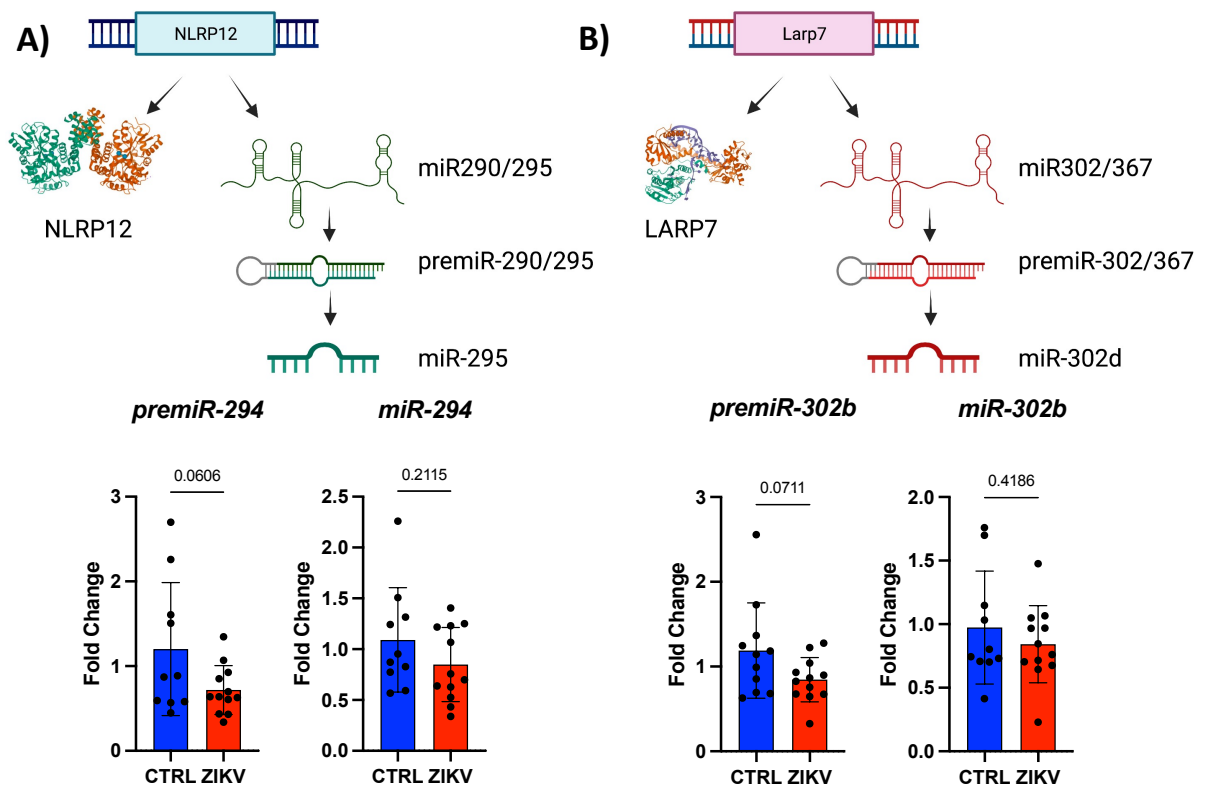
pre-miRNA por DICER e em miRNA maduro, o qual regulam a expressão de mRNAs<sup>89</sup>. Sabendo disso, decidimos avaliar também os níveis de expressão de *premiR-295* e *premiR-302d*. Nós observamos que após 72 h de infecção pelo ZIKV, houve um aumento da transcrição dos genes *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente, dos *premiR-295* e *premiR-302d* (Figura 27C).



**Figura 27. ZIKV promove a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7*, e conseqüentemente dos *miR-295* e *miR-302d* em astrócitos primários de neonatos de SJL. A) Posição do *miR-295* no gene *Nlrp12*. B) Posição do *miR-302d* no gene *Larp7*. Figuras criadas pelo BioRender.com. Os astrócitos murinos de SJL foram infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h de infecção, analisamos a expressão gênica de C) *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7* e *premiR-302d*. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .**

De forma interessante, o *miR-295* faz parte do *cluster* dos *miR-290-295*, que está localizado dentro do gene de *Nlrp12*, o qual é altamente conservado entre espécies, sendo homólogo ao *cluster* *miR-371-373* humano<sup>125</sup> (Figura 28A). Já o *miR-302d* faz parte do *cluster* *miR-302-367*, e também altamente conservado entre os vertebrados<sup>126</sup> (Figura 28B). Sendo assim, decidimos avaliar outros miRNAs pertencentes ao *cluster* *miR-290-295* e ao *miR-302-367*. Para tanto, avaliamos a expressão do *premiR-294* e do *miR-294* maduro, o qual faz parte do *cluster* *miR-290-295* (Figura 28A), e a expressão do *premiR-302b* e do *miR-302b* maduro, o qual faz parte do *cluster* *miR-302-367* (Figura 28B). Não observamos diferença na transcrição desses miRNAs, sugerindo que haja algum mecanismo de regulação que faça com que apenas os *miR-295* e *miR-302b* sejam aumentados durante a infecção (Figura 28A-B).

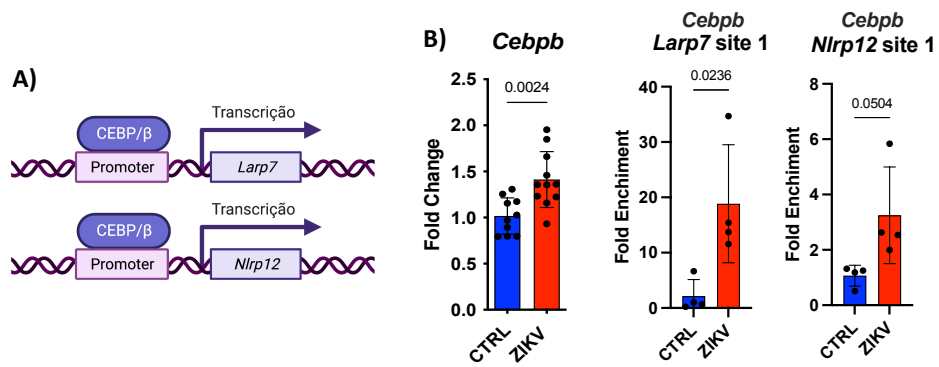
Portanto, identificamos que o *miR-295* é transcrito juntamente com o gene *Nlrp12* e o *miR-302b* com o gene *Larp7*, enquanto que os outros miRNAs pertencentes de seus *clusters* sofrem regulação e não aumentam com a infecção pelo ZIKV.



**Figura 28.** ZIKV promove a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7*, mas não dos miRNAs da mesma família dos miR-295 e miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL. Os astrócitos murinos de SJL foram infectados ou não com ZIKV (MOI=1). Após 72h de infecção, analisamos a expressão gênica de **A)** *premiR-294* e *miR-294*, pertencente à mesma família do miR-295, e do **B)** *premiR-302b* e *miR-302b*, pertencente à mesma família do miR-302d. (N=12). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ . Figuras criadas pelo BioRender.com.

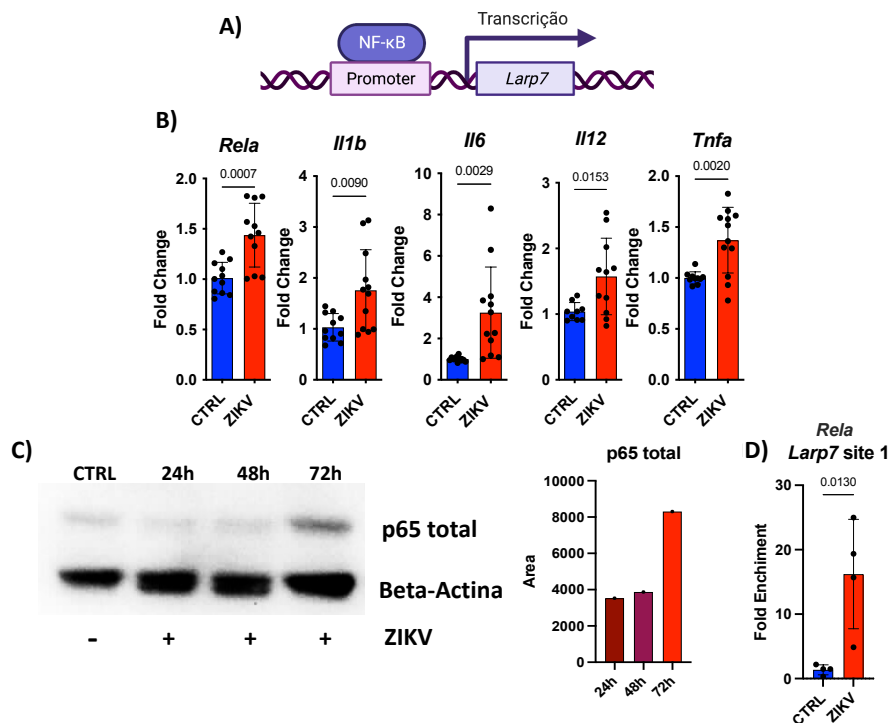
**4.13. ZIKV induz a expressão de C/EBPβ e p65 para promover a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente, aumentar os níveis de miR-295 e miR-302d.**

Nosso próximo passo foi avaliar como o ZIKV estaria induzindo a transcrição dos genes *Nlrp12* e *Larp7*. Para isso, utilizamos a plataforma “*Signaling Pathways*” e descobrimos que o fator de transcrição em comum entre os dois genes é o C/EBPβ (*CCAAT Enhancer Binding Protein*) (**Figura 29A**). Dessa forma, observamos que o ZIKV foi capaz de induzir a expressão de *Cebpb* (**Figura 29B**) e de seu recrutamento para o promotor dos genes *Nlrp12* e *Larp7* após 72 h de infecção pelo ZIKV (**Figura 29C**), avaliado por ensaio de ChIP (*Chromatin immunoprecipitation*).



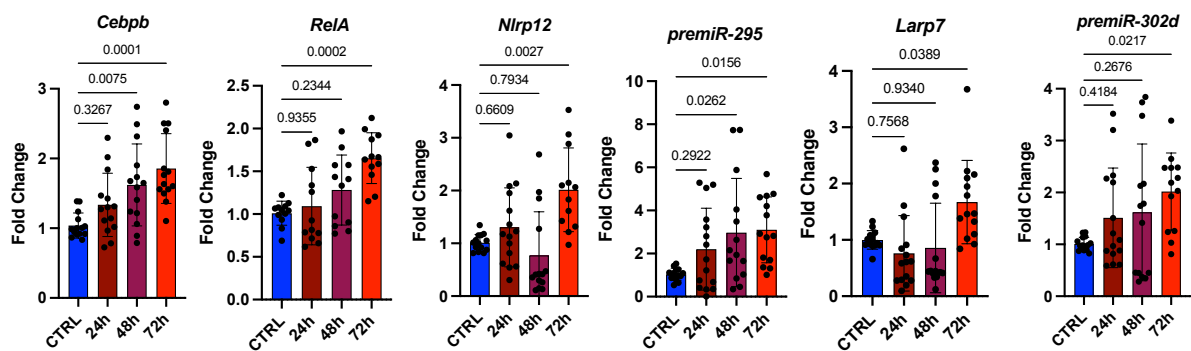
**Figura 29.** ZIKV promove a ativação de C/EBP $\beta$  para transcrever *Nlrp12* e *Larp7*, e conseqüentemente os miR-295 e miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL. **A)** Esquema demonstrando que o fator de transcrição C/EBP $\beta$  interage com os promotores dos genes *Nlrp12* e *Larp7*. Figura criada no BioRender.com. Análise da **B)** expressão gênica de *Cebpb* (N=12) e **C)** imunoprecipitação da cromatina (ChIP) de *Cebpb* para avaliar seus sítios de ligação nos promotores dos genes *Nlrp12* e *Larp7* (N=4). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Curiosamente, é sabido que o C/EBP $\beta$  e a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B agem em sinergismo, e utilizando a plataforma “*Signaling Pathways*” descobrimos que o fator de transcrição p65 também é capaz de levar à transcrição de *Larp7* (**Figura 30A**). Sendo assim, observamos que o ZIKV foi capaz de aumentar a proteína p65 total (**Figura 30C**), sua expressão gênica (gene conhecido como *Rela*) e de genes dependentes da sua ativação, como *Il1b*, *Il6*, *Il12* e *Tnfa* (**Figure 30B**). Além disso, observamos que o ZIKV induz o recrutamento de p65 para o promotor do gene *Larp7* (**Figura 30D**).



**Figura 30. ZIKV promove a ativação de NF-κB para transcrever *Larp7*, e consequentemente o miR-302d em astrócitos primários de neonatos de SJL.** A) Esquema demonstrando que o fator de transcrição NF-κB interage com o promotor do gene *Larp7*. Figura criada no BioRender.com. Análise da B) expressão gênica de *Rela* e dos genes transcritos pela ativação de NF-κB: *Il1b*, *Il6*, *Il12* e *Tnfa* (N=12). C) Análise da expressão proteica de p65 total por WB 24h, 48h e 72h pós infecção (esquerda) e sua quantificação (direita). D) Imunoprecipitação da cromatina (ChIP) de *Rela* para avaliar seus sítios de ligação no promotor do gene *Larp7* (N=4). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

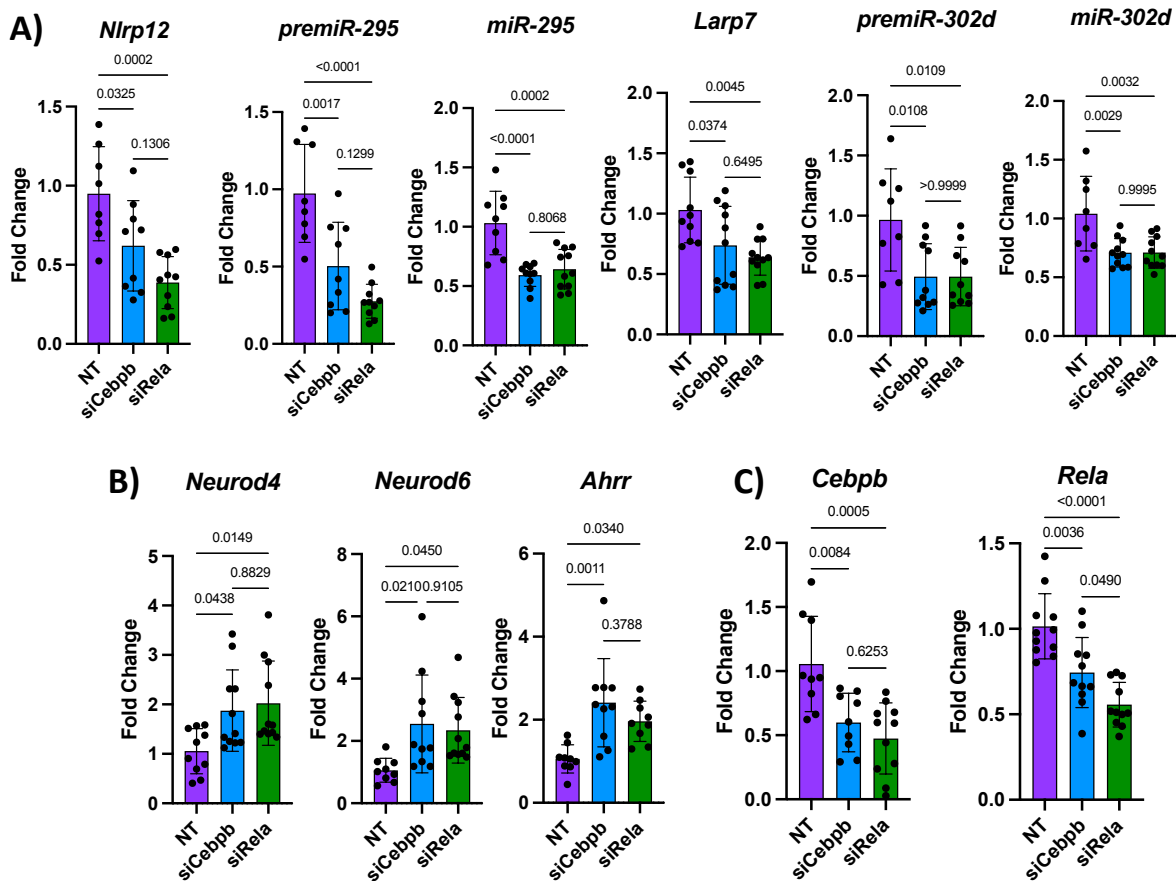
Vale ressaltar que a infecção por ZIKV só aumenta a expressão dos genes *Cebpb*, *Rela*, *premiR-295*, *Nlrp12*, *premiR-302d* e *Larp7* após 72 h de infecção em astrócitos (Figura 31).



**Figura 31. Análise da expressão gênica em astrócitos primários de neonatos de SJL em cinética de infecção pelo ZIKV.** Análise da expressão gênica de *Cebpb*, *Rela*, *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d* 24h, 48h e 72h após infecção pelo ZIKV (MOI=1; N=12) em astrócitos primários de neonatos de SJL. One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Para melhor entender o papel dos fatores de transcrição C/EBPβ e da subunidade p65 do NF-κB na indução da transcrição de *Nlrp12* e *Larp7*, para aumentar a expressão de miR-295 e miR-302d durante a infecção pelo ZIKV, utilizamos da estratégia de RNAs de interferência (*siRNA*) para reduzir os níveis de *Cebpb* e *Rela* em astrócitos infectados com ZIKV.

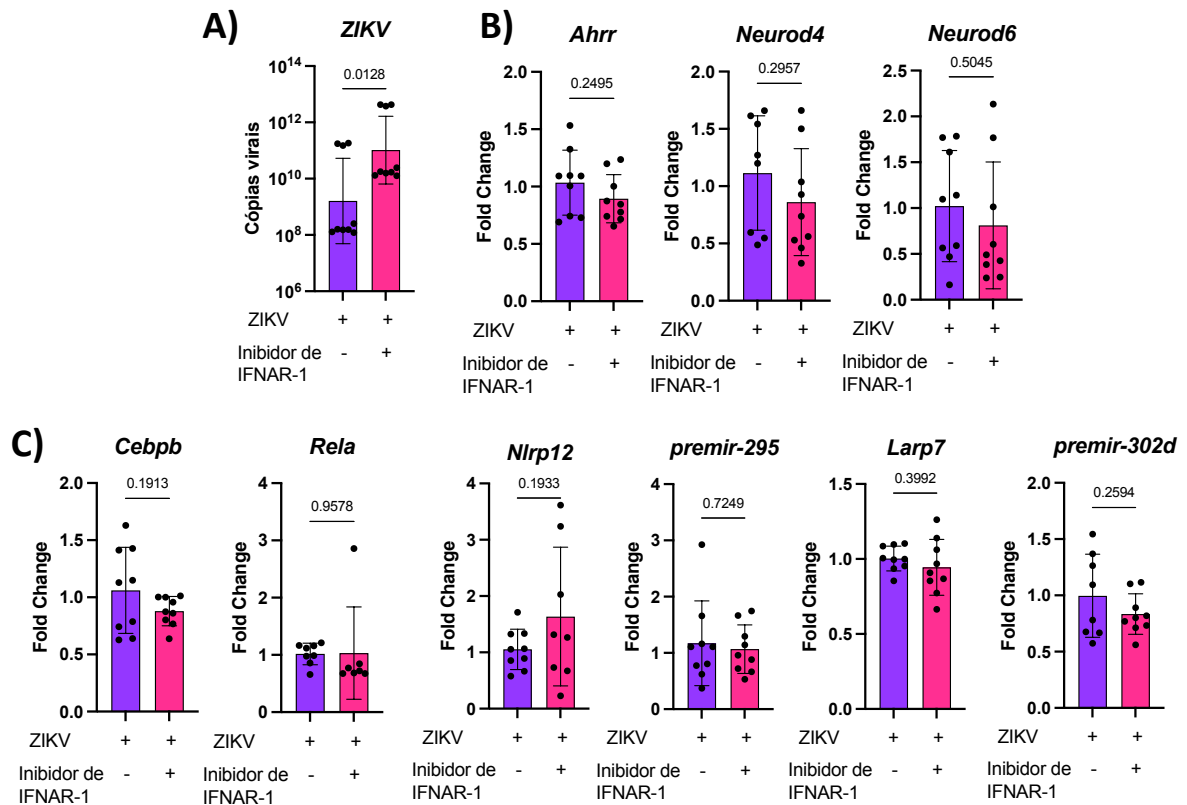
Primeiramente, validamos a diminuição da expressão de *Cebpb* e *Rela* pelo uso dos *siRNAs* (Figura 32C). Em seguida, observamos que a ausência dos fatores de transcrição C/EBPβ e da subunidade p65 do NF-κB leva à diminuição da expressão de *Nlrp12*, *premiR-295*, *miR-295*, *Larp7*, *premiR-302d* e *miR-302d* (Figura 32A), demonstrando a importância desses fatores para a transcrição dessas moléculas perante a infecção com ZIKV. Com a diminuição da expressão dos miR-295 e miR-302d causada pela inibição de C/EBPβ e p65, os genes alvos desses miRNAs, *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6*, tiveram sua expressão aumentada em relação do grupo NT (Figura 32B).



**Figura 32.** ZIKV induz ativação de CEBP/β e NF-κB para promover a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, consequentemente dos miR-295 e miR-302d para modular resposta imune e neurodesenvolvimento em astrócitos primários de neonatos de SJL. Os astrócitos primários de neonatos de SJL foram transfectados com *non-targeting* (NT), *Cebpb* e *Rela* siRNA. Após 24h, os astrócitos foram infectados pelo ZIKV (MOI=1) por 72h e submetidos a análise da expressão gênica de **A)** *Nlrp12*, *premiR-295*, *miR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, *miR-302d*, **B)** *Neurod4*, *Neurod6*, *Ahrr*, **C)** *Cebpb* e *Rela* para confirmar o silenciamento. (N=12). One-Way ANOVA, média e desvio padrão. Comparação com o grupo NT. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

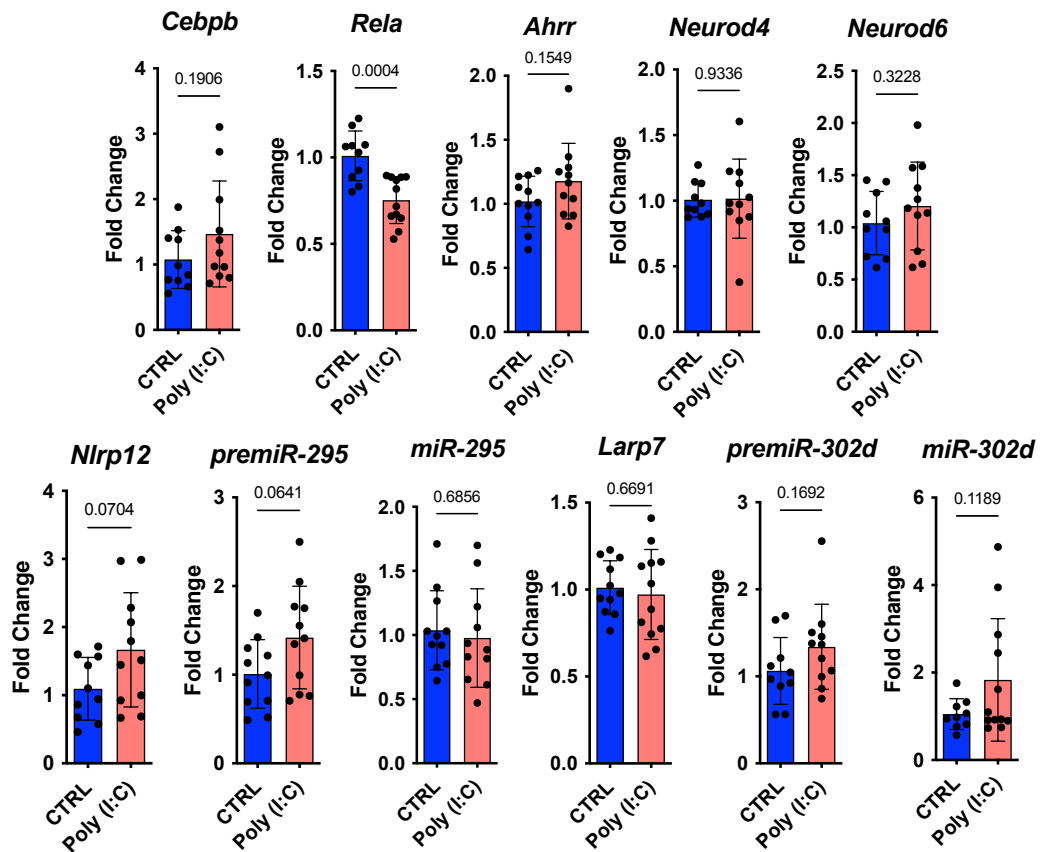
Nosso próximo passo foi investigar se a ativação desses fatores de transcrição pelo ZIKV era um mecanismo indireto da infecção. As principais vias disparadas perante à infecção viral são: ativação de TLR3 e sinalização de IFNAR. Portanto, decidimos avaliar o papel da sinalização destes na modulação da expressão dos genes envolvidos na via que induz o aumento dos miR-295 e miR-302d. Para tanto, previamente tratamos previamente os astrócitos com inibidor de IFNAR-1 e depois infectamos por mais 72 h. Primeiramente, demonstramos a importância da sinalização de IFNAR no controle da infecção, uma vez que a inibição desse receptor aumentou o número de cópias virais de ZIKV (**Figura 33A**). Porém, ao avaliar a via previamente descrita por ser responsável pelo aumento a expressão dos miR-295

e miR-302d, não foi modulada pela inibição de IFNAR (Figura 33C). Consequentemente, também não houve diferença na expressão de *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* (Figura 33B).



**Figura 33. A ativação da via CEBP/β, NF-κB, NLRP12, LARP7, miR-295 e miR-302d não é dependente da ativação de IFNAR-1.** Os astrócitos primários de neonatos de SJL foram tratados com o inibidor de IFNAR-1 durante 24h. Em seguida, os astrócitos foram infectados pelo ZIKV (MOI=1) por 72h e submetidos a análise da expressão gênica de **A) *Ddx58*** e ZIKV confirmando a inibição dessa via, **B) *Ahrr*, *Neurod4*, *Neurod6***, **C) *Cebpb*, *Rela*, *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7* e *premiR-302d***. (N=8-9). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo Controle isotipo. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

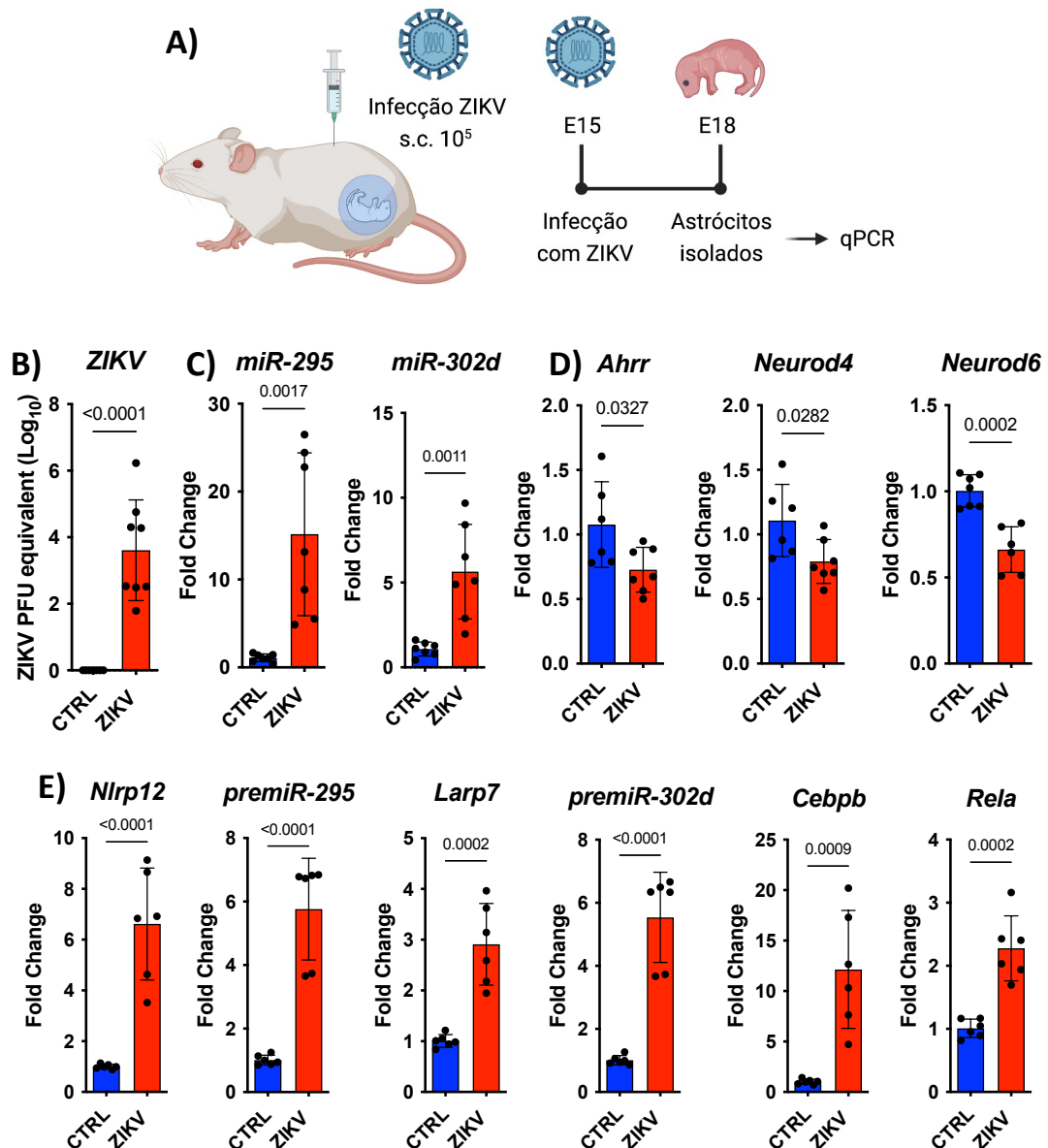
Em seguida, utilizamos a molécula Poly (I:C), um mimetizador de dsRNA e ativador de TLR3 para avaliar sua importância na produção dos miR-295 e miR-302d. Interessante observar que a ativação de TLR3 não foi capaz de induzir a ativação de *Cebpb* e *Rela* e, consequentemente, não aumentou a expressão de *Nlrp12*, *premiR-295*, *miR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, *miR-302d*. Sendo assim, a expressão de *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* também não foi modulada (Figura 34). Portanto, a ativação da IFNAR-1 e TLR3 não influenciam na expressão das moléculas envolvidas no aumento dos miR-295 e miR-302d pelo ZIKV.



**Figura 34.** A ativação da via CEBP/ $\beta$ , NF- $\kappa$ B, NLRP12, LARP7, miR-295 e miR-302d não é dependente da ativação de TLR3. Os astrócitos primários de neonatos de SJL foram estimulados com o ligante de TLR3, o Poly (I:C) por 72h e submetidos a análise da expressão gênica de *Cebpb*, *Rela*, *Ahrr*, *Neurod4*, *Neurod6*, *Nlrp12*, *premiR-295*, *miR-295*, *Larp7*, *premiR-302d* e *miR-302d*. (N=12). T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Posteriormente, decidimos avaliar se as moléculas envolvidas no aumento dos miR-295 e miR-302d estariam reguladas positivamente também *in vivo* durante a transmissão vertical pelo ZIKV. Para isso, realizamos o *cell sorting* dos astrócitos do cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas ou não. Assim, as fêmeas SJL prenhes foram infectadas em E15 com  $10^5$  PFU de ZIKV e em E18 o cérebro dos filhotes foi processado e os astrócitos isolados por *cell sorting* para análise da expressão gênica por qPCR (Figura 35A). Primeiramente, confirmamos a presença do RNA viral do ZIKV nos astrócitos isolados do cérebro dos filhotes nascidos de mães infectadas (Figura 35B). Corroborando os experimentos *in vitro*, observamos aumento na expressão dos miR-295 e miR-302d (Figura 35C) assim como a diminuição de seus genes alvo, *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* (Figura 35D). E, conforme esperado, observamos um aumento da expressão dos genes *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, *Cebpb* e *Rela* (Figura 35E). Sendo assim, demonstramos que a via responsável por aumentar a

expressão dos miR-295 e miR-302d em astrócitos *in vivo* durante a transmissão vertical é a mesma observada *in vitro*.

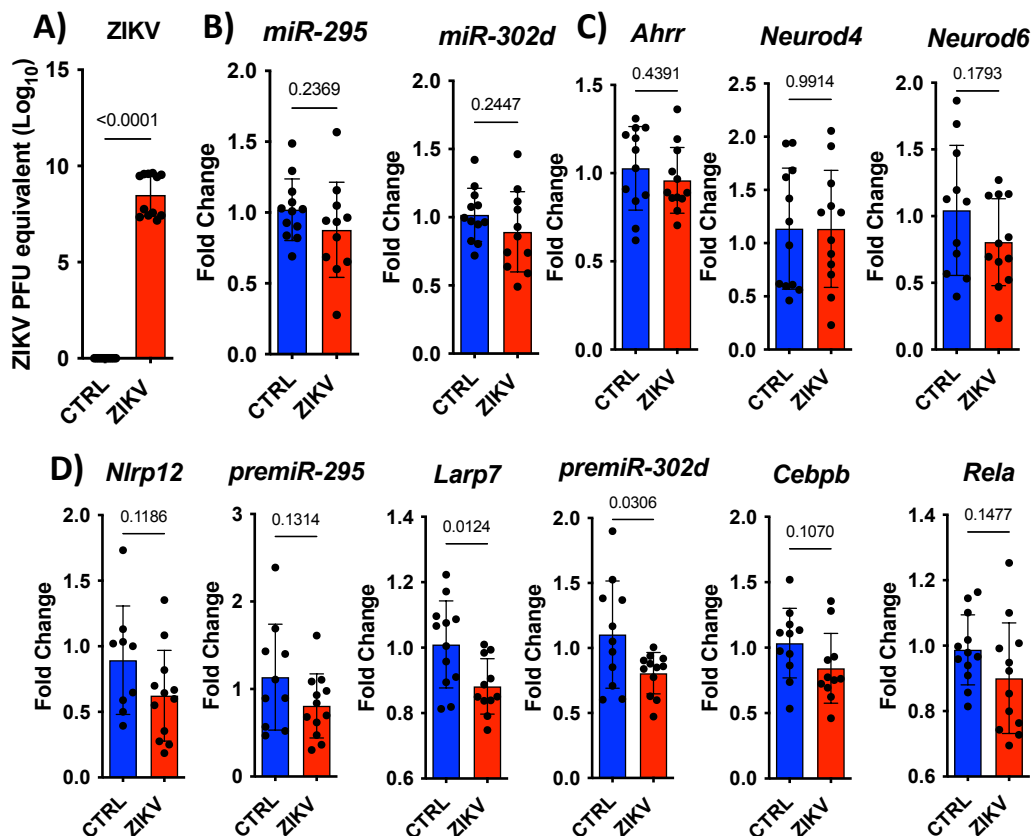


**Figura 35.** ZIKV induz ativação de CEBP/β e NF-κB para promover a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, consequentemente dos miR-295 e miR-302d para modular resposta imune e neurodesenvolvimento em astrócitos isolados de neonatos nascidos de mães SJL infectadas. **A)** Animais SJL fêmeas prenhes (N=3) foram infectados via subcutânea com 10<sup>5</sup> PFU em 20 μL de PBS 1X no 15º dia de gestação. Os animais controles receberam o mesmo volume de PBS pela mesma via de inoculação no mesmo período de gestação. Em E18, o cérebro dos filhotes foi processado e os astrócitos isolados por *cell sorting* para análise da expressão gênica. (N=6-8, sendo uma replicata o pool de três filhotes). Figura criada no BioRender.com. **B)** ZIKV PFU equivalente. Expressão gênica de **C)** *miR-295*, *miR-302d*, **D)** *Ahrr*, *Neurod4*, *Neurod6*, **E)** *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, *Cebpb* e *Rela*. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .



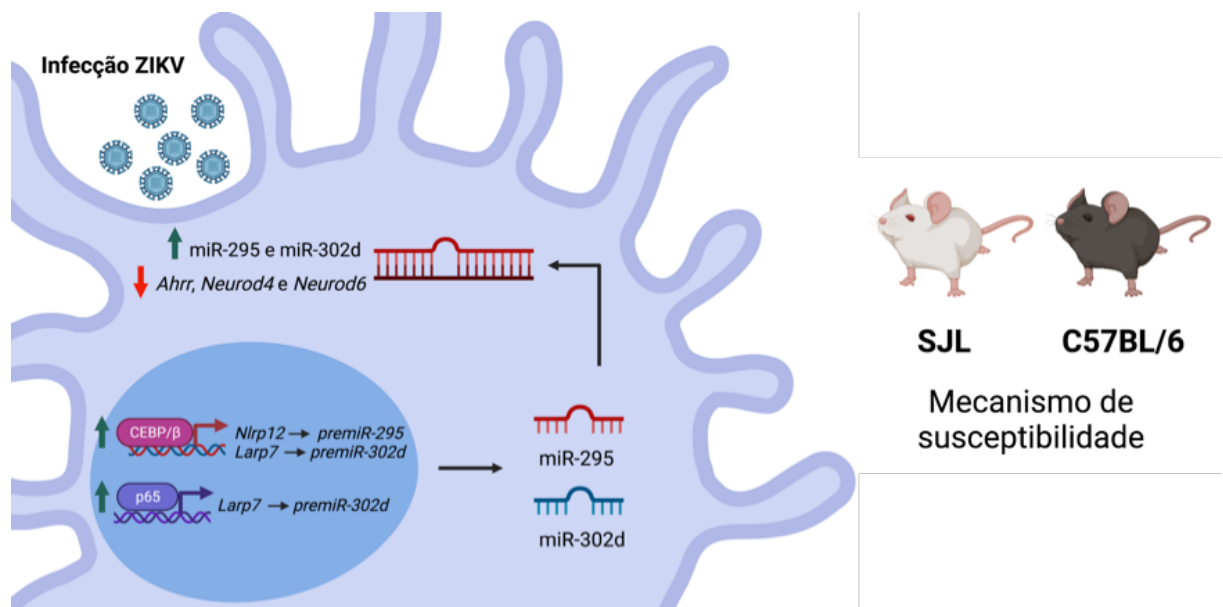
#### 4.14. C/EBP $\beta$ , p65, NLRP12, LARP7, miR-295 e miR-302d são fatores responsáveis pela suscetibilidade à infecção pelo ZIKV.

Por último, investigamos se essa via responsável por aumentar os miR-295 e miR-302d, poderia ser um mecanismo de susceptibilidade à neuropatogênese induzida durante à infecção pelo ZIKV. Dessa forma, avaliamos a expressão gênica de todos os genes envolvidos nessa via em astrócitos primários provenientes de animais C57BL/6 WT, animais conhecidamente como resistentes à transmissão vertical do ZIKV e à microcefalia<sup>35</sup>. Nós observamos que o ZIKV é capaz de infectar os astrócitos de animais C57BL/6 WT *in vitro* (Figura 36A), porém não foi capaz de aumentar a expressão dos miR-295 e miR-302d maduros (Figura 36B) e, conseqüentemente, não observamos diferença na expressão de *Neurod4*, *Neurod6* e *Ahrr* (Figura 36C). Além disso, não observamos aumento na expressão de *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, *Cebpb* e *Rela* (Figura 36D).



**Figura 36.** Expressão gênica de astrócitos primários de neonatos de C57BL/6 WT. Análise da expressão gênica em astrócitos primários de animais C57BL/6 WT após 72h de infecção pelo ZIKV (MOI=1, N=12). **A)** ZIKV PFU equivalente. **B)** *miR-295*, *miR-302d*, **C)** *Ahrr*, *Neurod4*, *Neurod6*, **D)** *Nlrp12*, *premiR-295*, *Larp7*, *premiR-302d*, *Cebpb* e *Rela*. T-test, média e desvio padrão. Comparação com o grupo controle. Gráficos representam a junção de 3 experimentos independentes. Considerado estatisticamente diferente  $p < 0,05$ .

Portanto, podemos sugerir que o ZIKV ativa os fatores de transcrição C/EBP $\beta$  e a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B, que irão transcrever os genes *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente, os miR-295 e miR-302. Esses miRNAs regulam a expressão de *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* *in vivo* e *in vitro*, diminuindo a resposta imune para favorecer a replicação viral e prejudicando o neurodesenvolvimento em animais SJL suscetíveis, mas não em animais C57BL/6 WT resistentes, sugerindo um mecanismo de suscetibilidade à microcefalia ou às lesões neurológicas causadas pelo ZIKV (**Figura 37**).



**Figura 37. Mecanismo de suscetibilidade e resistência perante a infecção pelo ZIKV.** A infecção pelo ZIKV induz ativação dos fatores de transcrição CEBP/β e NF- $\kappa$ B para promover a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente dos miR-295 e miR-302d, modulando a resposta imune e neurodesenvolvimento em astrócitos de animais SJL suscetíveis a transmissão vertical, mas não em animais C57BL/6 WT resistentes a infecção. Figura criada no BioRender.com.

## 5. DISCUSSÃO

A capacidade reguladora dos miRNAs tem sido descrita ao longo dos anos em muitas espécies de plantas e animais, uma vez que formam o complexo silenciador RISC e interagem com sequências alvo complementares de mRNAs com objetivo de reprimi-los pós-transcricionalmente<sup>70</sup>. Suas participações têm sido estudadas tanto no desenvolvimento<sup>127</sup> e diferenciação celular, como em diversas doenças, como no câncer<sup>128-130</sup>, diabetes<sup>131,132</sup>, esclerose múltipla<sup>133-135</sup> e infecções virais, incluindo as infecções por flavivírus neurotrópicos<sup>136-138</sup>.

O papel dos miRNAs durante infecções por flavivírus tem sido descrito de forma ambígua, uma vez que alguns podem auxiliar na replicação viral e morte celular, como o miR-29c que é capaz de induzir a replicação do vírus da síndrome reprodutiva e respiratória dos suínos (PRRSV - *Porcine Reproductive and Respiratory Syndrome Virus*) em macrófagos alveolares<sup>139</sup>, ou até mesmo o miR-21, que promove a replicação do DENV em células humanas de carcinoma de fígado<sup>140</sup>. Enquanto isso, outros miRNAs favorecem a resposta imune antiviral impedindo a propagação do vírus, como durante a infecção por JEV, onde há o aumento da expressão do miR-15b, desencadeando a inibição de RNF125 (*Ring Finger Protein 125*), um regulador negativo da sinalização de RIG-I, levando ao aumento da resposta inflamatória, incluindo a produção dos IFN tipo I e à diminuição da ativação glial e do dano neuronal<sup>141</sup>.

Por outro lado, poucos trabalhos demonstraram a participação dos miRNAs durante a imunopatogênese da infecção pelo ZIKV e da microcefalia. Recentemente, foi demonstrado que o capsídeo do ZIKV interage diretamente com Dicer para facilitar a infecção. Usando um mutante do capsídeo (H41R), foi observado que o ZIKV perde a capacidade de inibir a neurogênese e a corticogênese. Portanto, a interação entre o capsídeo do ZIKV H41R e Dicer é necessária para a patogênese e as lesões características da infecção<sup>142</sup>. Além disso, foi observado que a proteína E do envelope do ZIKV é capaz de aumentar a expressão dos miR-204 e miR-1273g reprimindo os genes *Notch2* e *Pax3* em NPCs. Dessa forma, esses miRNAs levam à quiescência de NPCs, aumentando o número de células na fase do ciclo celular G0/G1, além de induzir sua morte por apoptose, prejudicando ainda mais a diferenciação e migração neuronal<sup>143</sup>. Também foram identificados 47 miRNAs no genoma do ZIKV, os quais possuem como alvos vias envolvidas na regulação de sinalizações celulares, funções neurológicas e no desenvolvimento fetal<sup>144</sup>. Tais achados evidenciam a importância dos estudos do papel dos

miRNAs na infecção pelo ZIKV, uma vez que muito pouco se sabe sobre seu papel na patogênese da microcefalia causada pelo ZIKV, o que torna nosso trabalho extremamente relevante.

Nossos resultados demonstraram que o ZIKV altera o perfil de expressão de miRNAs que regulam elementos da resposta imune, da neurogênese e da morte celular, uma vez que foram capazes de regular positivamente a expressão de 10 miRNAs no cérebro total de filhotes SJL nascidos de mães infectadas, sendo eles: miR-let-7d, miR-let-7e, miR-23a, miR-24, miR-146a, miR-155, miR-196b, miR-291a, miR-295 e miR-467c, enquanto reduziu a expressão do miR-32.

O miR-32 é conhecido por ser altamente expresso em tecidos cancerígenos e inibir a apoptose<sup>145</sup>. Além disso, o uso do miR-32 mímico inibe a autofagia das células musculares<sup>146</sup>. Portanto, nossos resultados corroboram com a literatura, pois alguns miRNAs são conhecidos por inibir a apoptose e autofagia, e justamente esses foram regulados negativamente no cérebro total, assim, favorecendo a morte celular por apoptose e autofagia causada pelo ZIKV. Embora não tenhamos testado os alvos preditos do miR-32, observamos que esse miRNA regula genes relacionados com ubiquitinação. Já foi demonstrando que a poliubiquitinação por TRIM7 da proteína E do ZIKV auxilia na replicação viral<sup>147</sup>. Portanto, a regulação negativa de miR-32 pode levar ao aumento da expressão de genes que auxiliem a ubiquitinação de proteínas virais.

Os miRNAs let-7d e let-7e pertencem à família dos miRNAs let-7 juntamente com outros 8 miRNAs. No ano de 2000, o let-7 foi o segundo miRNA descoberto, sete anos após o Lin-4<sup>75</sup>, e também identificado em *C. elegans*<sup>148</sup>. Foi observado que a alta expressão do miR-let-7 leva ao desenvolvimento precoce dos vermes, acelerando os estágios larvais e os tornando adultos. Mais tarde, foi demonstrado que a família dos let-7 estavam relacionados com a regulação de diversas funções fisiológicas como, crescimento, desenvolvimento, homeostase celular e resposta imune, uma vez que regulam genes essenciais para mecanismos fisiológicos, incluindo o fator de transcrição NF-κB, c-Myc e reguladores de metilação do DNA<sup>149</sup>. Além disso, a expressão exógena do let-7 em ESCs (*Embryonic Stem Cells*) deficientes para esse *cluster*, recuperou a capacidade de diferenciação dessas células<sup>150</sup>, principalmente em estágios avançados de desenvolvimento embrionário<sup>151</sup>.

Os miR-23a e miR-24 compõem o *cluster* miR-23-27-24 e curiosamente apresentam funções diferentes perante às infecções virais. A infecção por PRRSV leva ao aumento da expressão do miR-24 para favorecer sua replicação, uma vez que esse miRNA reprime HO-1 (*Heme oxygenase-1*)<sup>152</sup>, uma proteína de choque térmico que suprime replicação viral<sup>153</sup>. Por outro lado, a expressão do miR-23 leva a ativação de IRF3/7 induzindo a produção de IFN tipo I e inibindo a replicação viral<sup>154</sup>.

Importante citar que a NS1 do ZIKV leva a regulação positiva do miR-146a, que por sua vez diminui a expressão de TRAF6 e STAT-1, suprimindo a resposta pró-inflamatória e antiviral em micróglia humana<sup>155</sup>. Como dito anteriormente, o miR-155 exerce um papel ambíguo durante infecções por flavivírus, mas durante a infecção por ZIKV o miR-155 encontra-se altamente expresso em neurônios humanos<sup>156</sup>. Em contraste, os miR-155 e miR-196b são regulados positivamente pela infecção por HCV (*Hepatitis C Virus*) em fases diferentes da doença, enquanto o miR-155 estimula a replicação viral, o miR-196b inibe e dessa forma, esses miRNAs podem ser usados como marcadores para diferentes fases da infecção<sup>157</sup>. Além disso, o miR-196b também foi identificado como biomarcador da fase latente do HIV<sup>158</sup>. Por outro lado, o miR-467 diminui a produção de citocinas inflamatórias como, IL-1 $\beta$ , IL-6, TNF- $\alpha$  e MCP-1 em macrófagos perante a alta quantidade de triglicérides<sup>159</sup>.

Como mencionado, os miR-291 e miR-295 fazem parte do *cluster* miR-290/295<sup>125</sup> e ambos foram aumentados no cérebro dos filhotes nascidos de mães infectadas com ZIKV. A família miR-290-295 desempenha um papel crucial e muito bem estabelecido nas células-tronco embrionárias de camundongo, regulando diferentes estágios do desenvolvimento embrionário<sup>121</sup>. Eles podem atuar: 1) na pré-implantação, onde o miR-294 diminui a expressão de *Cdkn1a* (p21) para manter o desenvolvimento do camundongo<sup>160</sup>; 2) no ciclo celular, diminuindo a expressão dos genes *Wee1* e *Fbxl5* para evitar o acúmulo de células na fase G1<sup>161</sup>; 3) no metabolismo, estimulando a glicólise por regular positivamente a expressão dos genes *Pkm2* e *Ldha*<sup>162</sup>; e 4) na pluripotência, aumentando os fatores de transcrição de células somáticas, bem como, *Oct4*, *Sox2*, *Klf4*, *cMyc/Nanog*<sup>163</sup>. O miR-291 em particular, é capaz de regular negativamente o fator de transcrição de diferenciação neurogênica 1 (*NeuroD1 - Neurogenic Differentiation 1*) e, como resultado, inibe a diferenciação de células-tronco em neurônio<sup>164</sup>.

Por outro lado, existem poucos trabalhos explicando o papel do miR-295. Em nossas análises de predição, evidenciamos os genes *Bcl2l11*, *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* como seus mRNAs-alvos e, por esta razão, decidimos aprofundar nossos estudos nesse miRNA. Aqui demonstramos que a rede de miRNAs modulada no cérebro dos filhotes nascidos de mães infectadas com ZIKV estimulam a autofagia. A importância da autofagia durante a infecção do vírus ganhou notoriedade ao longo dos anos, pois pode ter um papel ambíguo: 1) favorecendo a replicação do vírus e evadindo da resposta imune antiviral; ou 2) funcionar como sensor da presença do vírus e auxiliar na sua eliminação<sup>165,166</sup>.

A autofagia é um processo celular homeostático em que vacúolos, conhecidos como autofagossomos, são gerados para degradar componentes do citoplasma das células. Esses vacúolos são fundidos com os lisossomos formando os autofagolisossomos<sup>167</sup>. Assim, o material citoplasmático é degradado de forma dependente de lisossomo, reciclando macromoléculas malformadas ou mesmo para remodelação celular e defesa do hospedeiro contra patógenos, como a infecção por ZIKV<sup>168</sup>. O ZIKV usa a autofagia para melhorar sua replicação viral<sup>169</sup>. A cadeia leve 3 da proteína 1 associada ao microtúbulo (LC3-I) encontrada no citoplasma é conjugada com fosfatidiletanolamina (PE) e convertida em LC3-II, que é ligada à membrana e inicia a formação do autofagossomo<sup>170,171</sup>. A LC3-II interage com a p62, que é degradada pela via autofágica-lisossomal<sup>172</sup>.

O ZIKV usa componentes de autofagia, como ULK1, ATG9, BECN1, VPS34 e LC3B para promover a disseminação do vírus 48 horas após a infecção de células HeLa<sup>169</sup>. De modo intrigante, as proteínas não estruturais (NS) do ZIKV, NS4A e NS4B, inibem a sinalização Akt-mTOR, desencadeando a autofagia de progenitores neuronais, impactando na neurogênese e contribuindo para a patogênese associada ao ZIKV<sup>26</sup>. Além disso, NS2A também estimula a autofagia para diminuir a expressão da KPNA2 (*Karyopherin subunit alfa 2*), um transportador nucleocitoplasmático que ativa a proliferação e diferenciação celular<sup>173</sup>. Outro fato relevante é que a inibição do *Atg16l1*, um gene essencial da autofagia, e o uso da hidroxicloroquina e da enanderinanina J, inibidores da autofagia, limitam a transmissão vertical e a replicação do vírus<sup>174,175</sup>. A proteína da saliva de mosquitos, conhecida como alérgeno-1 do veneno do *Aedes aegypti* (AaVA-1), interage com a proteína LRPPRC (proteína contendo repetição de pentatricopeptídeos ricos em leucina), um regulador negativo de BECN1 (Beclin-1), permitindo a liberação de BECN1 e estimulando a autofagia e a transmissão do ZIKV<sup>176</sup>.

Consistentemente, nossos dados sugerem ativação de vias de autofagia indicada pelo aumento da expressão de vários genes da família TRIM. TRIM é uma superfamília de proteínas altamente conservadas com motivos de domínios amino-terminais RING, B-box, coiled-coil (RBCC)<sup>177</sup>. Foi demonstrado que as proteínas TRIM participam do processo autofágico<sup>178-180</sup>. Por exemplo, TRIM5 interage com p62 para ativar ULK1 e BECN1<sup>178</sup>, ao mesmo tempo que TRIM22 e TRIM50 também ativam BECN1<sup>181,182</sup>. Nossos dados também mostraram uma expressão aumentada de *Tlr2*, *Igtp* e *Irgm1*. TLR2 aumenta a ativação de JNK/ERK1/2 para promover LC3 e estimular a autofagia em macrófagos infectados por *Staphylococcus aureus*<sup>183</sup>. Por outro lado, *Igtp* e *Irgm1* são genes importantes estimulados pelo IFN- $\gamma$  em promover a formação de vacúolos de autofagossomos, levando à eliminação de patógenos<sup>184,185</sup>. Curiosamente, outros genes relacionados à autofagia aumentaram no cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas, como *Hspb8*, *Hpse* e *Plekhf1*. Foi demonstrado que a proteína de choque térmico B8 (HSPB8) estimula a autofagia durante a lesão do nervo óptico de camundongos<sup>186</sup>, enquanto que a phafin1 (*Plekhf1*) auxilia na formação do autofagossomos<sup>187</sup> e heparanase (*Hpse*) é regulado positivamente estimulando a autofagia durante a progressão do tumor no câncer de mama<sup>188</sup>.

Nosso trabalho, mostra pela primeira vez que o miR-295 interage com o gene *Bcl2l11* no cérebro total e em astrócitos primários de camundongos neonatos de SJL infectados com ZIKV. Existem muitos reguladores da autofagia, incluindo o pró-autofágico Beclin-1 (BECN1) e o pró-apoptótico BCL2L11 (também conhecido como BIM)<sup>189</sup>. Embora a função apoptótica de BCL2L11 seja bem descrita, recentemente foi demonstrado que BCL2L11 sequestra BECN1 para a cadeia leve de dineína 1 (DYNLL), impedindo a liberação de BECN1 dos microtúbulos e, conseqüentemente inibindo a autofagia<sup>189</sup>. Portanto, aqui demonstramos que o ZIKV modula a rede de miRNAs para estimular a autofagia.

Consistentemente, observamos uma modulação relevante de miRNAs durante a infecção do ZIKV e podemos ver que esses miRNAs exercem diferentes funções perante diversas infecções e estímulos. Além disso, observamos uma diminuição na expressão de *Tgfbr1* no cérebro total dos filhotes nascidos de mães infectadas. Interessantemente, esse gene não é alvo de nenhum dos miRNAs regulados positivamente pela infecção, porém ele é alvo dos miRNAs da família miR-302/367, como do miR-302d aumentado nos astrócitos. Esses miRNAs já são bem conhecidos por se ligarem no mRNA do receptor do tipo 2 de TGF- $\beta$

(*Tgfr2*), diminuindo a expressão desse receptor e promovendo a invasão e crescimento do carcinoma hepatocelular<sup>190</sup> e agravando o fenótipo de células nefropáticas<sup>191</sup>. Como realizamos as análises com o cérebro total, incluindo diferentes regiões anatômicas, tipos celulares e respostas imunes locais, acreditamos que a regulação de alguns miRNAs tenha sido mascarada por conter muitas informações no cérebro total e por isso decidimos avaliar especificamente os astrócitos.

Os astrócitos são células da glia heterogêneas e muito abundantes no SNC. Fornecem suporte crucial para a geração e o funcionamento dos neurônios, demonstrando a necessária interação entre essas duas células. De fato, os astrócitos são considerados as principais células envolvidas no controle da homeostase do SNC desempenhando uma série de funções chave, como: modulação de níveis extracelulares de neurotransmissores e íons; regulação da sinaptogênese<sup>192</sup>; fornecimento de energia e metabólitos à neurônios<sup>193</sup>, manutenção da barreira hematoencefálica (BHE)<sup>194</sup>, entre muitos outros. Dessa forma, entender o papel dos miRNAs em astrócitos durante a infecção pelo ZIKV e sua correlação com a microcefalia, se tornam de extrema relevância.

Nossos dados demonstraram que o ZIKV foi capaz de aumentar a expressão dos miR-295 e miR-302d em astrócitos primários de camundongos SJL. Em consonância, outros grupos observaram o aumento da expressão dos miR-30e-3p, miR-30e-5p e miR-17-5p na presença do ZIKV<sup>195</sup>. Embora não tenhamos encontrado os mesmos *miRNAs* modulados pela infecção em outros trabalhos, vale ressaltar que nós utilizamos astrócitos murinos primários de SJL e não uma linhagem de astrócitos humanos e, ainda, utilizamos a cepa de vírus brasileiro BeH815744, enquanto os outros trabalhos utilizaram a cepa de porto rico (PRVABC59).

A predição dos mRNAs-alvos dos miR-295 e miR-302d mostrou que o ZIKV foi capaz de diminuir a expressão de *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6* nos astrócitos primários de SJL. Ademais o *Ahrr* também teve sua expressão diminuída no cérebro total dos filhotes nascidos de mães infectadas pela ação do miR-295. Em seguida, nós comprovamos que esses miRNAs interagem com esses genes pelo uso de inibidores e mimicos dos miRNAs *in vivo* e *in vitro* e por ensaio de luciferase. Embora já tenham demonstrado que o miR-125b é capaz de regular a expressão de *Ahrr*<sup>196</sup>, essa é a primeira vez a ser descrita a interação entre miR-295/miR-302d-*Ahrr*.

Nós comprovamos que o miR-295 e miR-302d diminuem a expressão de *Ahrr* e o uso de inibidores desses miRNAs reduziram a expressão de *Ahr*. Dessa forma, decidimos avaliar a importância dessa via durante a infecção pelo ZIKV. Nós observamos que a inibição do AHR



durante a infecção por ZIKV na gestação diminui a transmissão vertical, uma vez que observamos menor número de cópias virais no cérebro, baço, olhos e placenta dos fetos tratados. Além disso, os fetos apresentaram tamanho do córtex cerebral, da cabeça, do cérebro total e do corpo semelhantes aos animais não infectados. Já foi observado que a infecção pelo ZIKV aumenta a sinalização de AHR, haja vista o aumento dos seus alvos transcricionais *Cyp1a1* e *Cy1b1*, e de seu ligante quinurenina, em células derivadas do fígado humano (HepG2)<sup>197</sup>. Ademais, o agonista de AHR, I3S (*indoxyl-3-sulfate*), promoveu a replicação do ZIKV, enquanto que o antagonista, CH22319, diminuiu em células HepG2<sup>197</sup>. Curiosamente, foi demonstrado que o AHR estimula a formação de autofagolisossomos<sup>198</sup>, o que corrobora nossos dados. Sendo assim, quando os miR-295 e miR-302d diminuem a expressão de *Ahrr*, eles estimulam a sinalização de AHR e, conseqüentemente, a autofagia.

Além disso, já foi descrito um papel fundamental do AHR perante outras infecções, como por exemplo, por coronavírus. Pacientes infectados por SARS-CoV-2 apresentaram aumento da sinalização de AHR e sua inibição suprime a replicação viral de HCoV-229E, causador da gripe comum em células HuH-7 e do SARS-CoV-2 em célula Calu-3 e Vero<sup>199</sup>. Dessa forma, podemos sugerir que a sinalização de AHR é um importante modulador da resposta imune antiviral<sup>200</sup> e que o ZIKV utiliza dos miRNAs para favorecer essa via e, conseqüentemente sua replicação.

Em seqüência, também identificamos pela primeira vez que os miR-295 e miR-302d regulam os genes *Neurod4* e *Neurod6*. A expressão de *Neurod4* já foi descrita por ser regulada por alguns miRNAs, incluindo: miR-137<sup>201</sup>, miR-325-3p<sup>202</sup>, miR-340-5p<sup>203</sup> e o miR-544a<sup>204</sup>, enquanto que o miR-486 reprime o *Neurod6*<sup>205</sup>. As moléculas NeuroD1, NeuroD2, NeuroD4 e NeuroD6 pertencem à superfamília de fatores de transcrição hélice-volta-hélice (bHLH) e exercem um papel fundamental durante o neurodesenvolvimento<sup>206</sup>. Essa família possui 60-100 aminoácidos e se dimerizam para ligar ao DNA<sup>207</sup>. O desenvolvimento do SNC humano se inicia muito cedo, por volta de 11 dias de gestação, com a formação do tubo neural, seguida da diferenciação de NPCs para neurônios durante a neurogênese<sup>208</sup>. Dessa forma, o subgrupo NeuroD regula a proliferação e diferenciação celular durante a neurogênese<sup>209</sup>. Essas moléculas participam da diferenciação neuronal no córtex cerebral desde muito cedo, uma vez que a NeuroD4 e NeuroD6 são expressas desde o dia embrionário E12/E13. O NeuroD4 é altamente expresso na ZV e pode dimerizar com Neurog1 e Neurog2 para acelerar a neurogênese no córtex<sup>210</sup>. O NeuroD6 é expresso nas ZV, ZSV, zona intermediária (IZ) e na

placa de desenvolvimento cortical<sup>210,211</sup>. As NPCs as ZV que expressam NeuroD6, vão para a ZSV, as quais se diferenciam e proliferam para gerar neurônios glutamatérgicos que vão ocupar camadas corticais superiores<sup>212</sup>. Portanto, podemos perceber a extrema importância da expressão dessas moléculas durante a neurogênese, e quão prejudicial pode ser sua ausência no neurodesenvolvimento, auxiliando o aparecimento das lesões características causadas pela infecção do ZIKV.

Ademais, a importância dos miRNAs no desenvolvimento embrionário tem sido discutido nos últimos anos, uma vez que animais homozigotos *knockouts* (KO) para Dicer, um componente essencial para geração de miRNAs, não são viáveis e sofrem aborto espontâneo por volta do sétimo dia de gestação. Hoje em dia, há a disponibilidade de camundongos condicionais, nos quais a deleção de Dicer é realizada pelo sistema Cre-flox. Com o uso destes animais, foi demonstrado que neurônios dopaminérgicos sem Dicer sofrem apoptose progressiva, além de não gerar ESCs viáveis<sup>213</sup>.

Ainda, há trabalhos demonstrando a importância do miR-9 para o desenvolvimento do cérebro<sup>214</sup>, proliferação da glia radial e diferenciação neuronal e glial<sup>215</sup>. O miR-9 é altamente conservado em todos os mamíferos e, em roedores, é especificamente expresso no cérebro, sendo principalmente em NPCs durante a diferenciação neuronal. Animais nocautes (KO) para miR-9 apresentam os hemisférios cerebrais, bulbo olfatório e outras partes do cérebro menores em comparação a animais WT, além da diminuição do córtex cerebral e ventriculomegalia, características semelhantes à microcefalia<sup>216,217</sup>. Além disso, já foi demonstrado que a diferenciação neuronal do córtex envolve a especificidade de células progenitoras intermediárias e o seu desenvolvimento é regulado por diversos miRNAs, incluindo o miR-9<sup>218,219</sup>.

Curiosamente, existem outros miRNAs que regulam o neurodesenvolvimento perante a infecção pelo ZIKV. As proteínas de ligação ao RNA do hospedeiro interagem com UTR do genoma viral regulando a replicação e tradução viral<sup>220</sup>. Um importante regulador do desenvolvimento de NPC, a proteína de ligação ao RNA Musashi-1 (MSI1), interage com o genoma do ZIKV e facilita a replicação viral<sup>221</sup>. Também foi demonstrado que durante o neurodesenvolvimento, Musashi-1 interage com MCPH-1 3' UTR para regular sua expressão para o funcionamento normal do cérebro. Porém, durante a infecção pelo ZIKV, o Musashi-1 se liga ao genoma do ZIKV 3'UTR para permitir a replicação viral e, conseqüentemente, leva ao comprometimento do neurodesenvolvimento<sup>221</sup>. Recentemente, a análise *post-mortem* do

cérebro de neonatos nascidos SCZ grave, mostrou a regulação positiva dos miR-145 e miR-148 e as análises de predição demonstraram alvos relacionados com vias de neurodesenvolvimento, diferenciação glial, neurogênese e desenvolvimento do córtex cerebral<sup>222</sup>. Portanto, podemos ver que os miRNAs têm papel fundamental durante o neurodesenvolvimento, e sua desregulação auxilia no mal funcionamento do cérebro.

Agora nós sabemos que os miR-295 e miR-302d reprimem a expressão dos genes *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6*, facilitando a replicação viral e prejudicando o neurodesenvolvimento. Nossa próxima pergunta foi como esses miRNAs são aumentados pela infecção? Usando plataformas bioinformáticas e procurando na literatura, vimos que o gene do miR-295 está codificado na fita antisense do gene *Nlrp12*<sup>123</sup>, enquanto que o miR-302d está na fita antisense do gene *Larp7*<sup>124</sup>. Portanto, quando os genes *Nlrp12* e *Larp7* são transcritos, as famílias dos miR-295 e miR-302d também serão.

O NLRP12 (*NLR family pyrin domain containing 12*) é um receptor de reconhecimento de padrões intracelular. Suas funções são bem controversas em diferentes doenças e estímulos, mas foi demonstrado que NLRP12 interage com TRIM25 para regular negativamente a sinalização de RIG-I, um forte indutor de resposta antiviral que leva a produção de altas quantidades de IFN tipo I<sup>223</sup>. Por outro lado, durante à infecção por flavivírus como, DENV, JEV e YFV, o NLRP12 inibe a replicação viral estimulando a produção de ISGs<sup>224</sup>. Curiosamente, NLRP12 estimula o recrutamento de neutrófilos via CXCL1 durante a infecção por Influenza A<sup>225</sup>. Isso nos leva a pensar que o ZIKV pode estar aumentando a expressão de NLRP12 para estimular o recrutamento de neutrófilos, que já foram descritos como capazes de carregar o ZIKV e auxiliar na sua disseminação<sup>226</sup>.

Já o *Larp7* é uma proteína de ligação do RNA, pertencente à família La, uma vez que se liga do RNA 7SK e forma o complexo snRNP (*small nuclear ribonucleoprotein*). Sua principal função descrita é ser um repressor transcricional por ser capaz de sequestrar P-TEFb (*positive transcription elongation fator b*) interromper a transcrição pela RNA polimerase II<sup>227</sup>. Dessa forma, faz sentido a infecção pelo ZIKV estimular a expressão de *Larp7*, para então diminuir a transcrição de forma geral e por consequência reprimir a transcrição de genes envolvidos na resposta imune antiviral. Em contraste, foi demonstrado que a inibição da RNA polimerase II por *Larp7* diminui a replicação do HIV-1<sup>228</sup>, o que nos faz pensar que talvez o hospedeiro aumenta a expressão de *Larp7* durante a infecção por ZIKV para tentar suprimir a replicação viral.

Portanto, mais estudos precisam ser feitos para entender o papel de NLRP12 e Larp7 na infecção pelo ZIKV. Aqui nós só demonstramos que a transcrição de NLRP12 e Larp7 levam ao aumento da expressão dos miR-295 e miR-302d, auxiliando na imunopatogênese da infecção. O nosso próximo passo foi ver fatores de transcrição em comum entre esses dois genes, e que poderiam estar levando ao aumento da transcrição deles e consequentemente dos miRNA. Para isso, utilizamos o website “*Signaling Pathways*” que possui um banco de dados de *ChIP-seq*, e ele nos mostrou que o fator de transcrição em comum aos dois genes é o C/EBP $\beta$ . C/EBP $\beta$  faz parte de uma família de seis fatores de transcrição, composto por um domínio transativador (TAD), domínio regulatório, domínio de ligação ao DNA e domínio zíper de leucina que se dimeriza, liga ao DNA e regula a transcrição de diversos genes<sup>229</sup>.

Além disso, é sabido que o C/EBP $\beta$  e a porção p65 do NF- $\kappa$ B agem em sinergismo<sup>230</sup>, uma vez que o *knockdown* de C/EBP $\beta$  diminui a translocação nuclear e a atividade de ligação ao DNA de p65 do NF- $\kappa$ B<sup>231</sup>. Essa interação também já foi descrita durante a regulação da IL-8, uma vez que essas moléculas agem em cooperação para estimular a produção dessa citocina<sup>232</sup>. Já o fator *IE1/2 enhancer/promoter* do citomegalovírus humano (HCMV) auxilia na iniciação da sua replicação viral<sup>233</sup> e foi demonstrando que o C/EBP $\beta$  e a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B interagem utilizando o promotor IE1/2<sup>234</sup>.

Ademais, pensamos que a ativação de C/EBP $\beta$  e NF- $\kappa$ B fosse um mecanismo indireto em resposta a presença do vírus, por isso decidimos avaliar vias disparadas perante à infecção. Como mencionado, a produção dos IFNs tipo I, a ativação de seus receptores IFNAR1 e IFNAR2 e a produção de ISGs são as primeiras respostas do sistema imune no combate aos vírus. Além disso, embora o ZIKV seja um vírus de RNA fita simples (ssRNA), durante a sua replicação é gerado um RNA de fita dupla intermediário de replicação (dsRNA), tendo como modelo o ssRNA. Dessa forma, o ZIKV pode ser reconhecido pelo TLR3 (do inglês – *Toll-like receptor 3*) e desencadeando a sua ativação<sup>235</sup>, inclusive em astrócitos<sup>118</sup>.

Entretanto, nossos resultados de qPCR, ChIP e silenciamento de RNA, sugerem que C/EBP $\beta$  e a porção p65 do NF- $\kappa$ B estão agindo em sinergismo para levar a transcrição de NLRP12 e Larp7 e, consequentemente, dos miR-295 e miR-302d nos astrócitos *in vitro* e nos astrócitos isolados do cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas, mas de forma independente da ativação de TLR3 e dos IFN tipo I.

Curiosamente, os mesmos resultados não foram observados em animais C57BL/6 WT, que foram demonstrados serem animais resistentes à infecção e a microcefalia<sup>35</sup>. Dessa forma, sugerimos que a via descrita neste trabalho é um mecanismo de susceptibilidade à infecção pelo ZIKV.

Portanto, aqui demonstramos a capacidade do ZIKV modular a expressão de miRNAs para favorecer a autofagia, incluindo o miR-295 que diminui a expressão do *Bcl2/11*, um potente fator anti-autofágico. Além disso, em astrócitos murinos, o ZIKV leva a ativação de C/EBP $\beta$  e da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B para induzir a transcrição de *Nlrp12* e *Larp7* e, conseqüentemente, a expressão de miR-295 e miR-302d. Por sua vez, esses miRNAs irão reprimir *Neurod4* e *Neurod6* prejudicando o neurodesenvolvimento, e o *Ahrr*, favorecendo a replicação viral, de forma independente de IFN tipo I e ativação de TLR3. Ademais, sugerimos que essa via seja um fator de resistência e susceptibilidade à infecção pelo ZIKV.

Em suma, nossos dados apontam para os miRNAs como potentes reguladores de processos biológicos perante à infecção pelo ZIKV, haja vista que modulam vias essenciais para o desenvolvimento cerebral e para neurogênese, para respostas inflamatórias e antivirais e estimula a autofagia, o que ratifica o papel prejudicial do ZIKV no SNC. Dessa forma, fornecemos dados de extrema importância, não só acerca da desconhecida infecção pelo ZIKV, mas também na elucidação dos mecanismos de lesão no SNC de bebês com microcefalia. Nossos achados poderão alicerçar, principalmente, futuros estudos com foco em intervenções terapêuticas e, quem sabe, auxiliar na erradicação das infecções provocadas pelo ZIKV.

## 6. CONCLUSÕES

- O ZIKV é capaz de alcançar o cérebro dos filhotes de animais SJL durante a gestação e modular o perfil de miRNAs;
- O ZIKV infecta astrócitos primários de SJL e modula o perfil de miRNAs.
- Os miRNAs modulados pela infecção com ZIKV *in vivo* e *in vitro*, têm como alvos genes envolvidos com a resposta imune, neurodesenvolvimento e morte celular.
- O ZIKV desregula o perfil de miRNAs estimulando a autofagia no cérebro de filhotes SJL.
- O ZIKV aumenta a expressão do miR-295 para regular negativamente a expressão de *Bcl2l11* e favorecer a autofagia no cérebro de filhotes SJL e em astrócitos primários de SJL.
- O ZIKV regula positivamente a expressão de miR-295 e miR-302d para reprimir *Ahrr* e, conseqüentemente, estimular a sinalização de AHR e favorecer sua replicação viral em astrócitos primários de SJL.
- O aumento da expressão dos miR-295 e miR-302d pelo ZIKV regula a expressão de *Neurod4* e *Neurod6* em astrócitos primários de SJL, prejudicando o neurodesenvolvimento.
- O aumento da expressão dos miR-295 e miR-302d pelo ZIKV, é uma consequência do aumento da transcrição dos genes *Nlrp12* e *Larp7*, respectivamente em astrócitos primários de SJL.
- Os fatores de transcrição C/EBP $\beta$  e a subunidade p65 do NF- $\kappa$ B induzem a transcrição de *Nlrp12*, *Larp7* e, conseqüentemente, dos miR-295 e miR-302d em astrócitos primários SJL infectados pelo ZIKV.
- A ativação do C/EBP $\beta$  e da subunidade p65 do NF- $\kappa$ B é independente da ativação de IFNAR-1 e TLR3 em astrócitos primários de SJL infectados por ZIKV.
- A capacidade do ZIKV induzir a ativação dos fatores de transcrição C/EBP $\beta$  e NF- $\kappa$ B para promover a transcrição de *Nlrp12*, *Larp7*, miR-295 e miR-302d e regular a resposta imune e o neurodesenvolvimento, também ocorre em astrócitos isolados do cérebro de filhotes SJL nascidos de mães infectadas.
- Astrócitos de animais C57BL/6 WT, resistentes ao desenvolvimento da SCZ, não induzem a ativação de C/EBP $\beta$  e NF- $\kappa$ B para promover a transcrição de *Nlrp12*, *Larp7*, miR-295 e miR-302d e regular a expressão de *Ahrr*, *Neurod4* e *Neurod6*, sugerindo um mecanismo de suscetibilidade e resistência à infecção pelo ZIKV.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Dick, G. W. A., Kitchen, S. F. & Haddow, A. J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* **46**, 509–520 (1952).
2. Kirya, B. G., Mukwaya, L. G. & Sempala, S. D. K. A yellow fever epizootic in Zika forest, Uganda, during 1972: Part 1: Virus isolation and sentinel monkeys. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **71**, 254–260 (1977).
3. Gordon Smith, C. E., Kirya, B. G. & Okia, N. O. A yellow fever epizootic in Zika Forest, Uganda, during 1972: Part 2: Monkey serology. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* **71**, 300–303 (1977).
4. Paixão, E. S., Barreto, F., da Glória Teixeira, M., da Conceição N. Costa, M. & Rodrigues, L. C. History, Epidemiology, and Clinical Manifestations of Zika: A Systematic Review. *Am J Public Health* **106**, 606–612 (2016).
5. Duffy, M. R. *et al.* Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* **360**, 2536–2543 (2009).
6. Pacific, N. *et al.* Zika Virus , French Polynesia , South Pacific , 2013. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 5–6 (2014).
7. Wæhre, T., Maagard, A., Tappe, D., Cadar, D. & Schmidt-Chanasit, J. Zika virus infection after travel to Tahiti, December 2013. *Emerging Infectious Diseases* **20**, 1412–1414 (2014).
8. Roth, A. *et al.* Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections – an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012–2014. *Eurosurveillance* **19**, 20929 (2014).
9. Brasil, P. *et al.* Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* **375**, 2321–2334 (2016).
10. Luz, K. G., Santos, G. I. V. dos & Vieira, R. de M. Febre pelo vírus Zika. *Epidemiol. Serv. Saúde* **24**, 785–788 (2015).
11. Ventura, C. V., Maia, M., Dias, N., Ventura, L. O. & Belfort, R. Zika: Neurological and ocular findings in infant without microcephaly. *The Lancet* **387**, 2502 (2016).
12. Polonio, C. M., de Freitas, C. L., Zanluqui, N. G. & Peron, J. P. S. Zika virus congenital syndrome: Experimental models and clinical aspects. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases* **23**, 1–9 (2017).
13. Brazilian Ministry of Health [http://combateaes.saude.gov.br/images/pdf/informe\\_microcefalia\\_epidemiologico15.pdf](http://combateaes.saude.gov.br/images/pdf/informe_microcefalia_epidemiologico15.pdf) . *Ministério da Saúde*.
14. Brasil, Saúde, M. da & Saúde, S. de V. em. Boletim epidemiológico 22. **49**, 1–13 (2018).
15. Brown, W. C. *et al.* Extended surface for membrane association in Zika virus NS1 structure. *Nature Structural and Molecular Biology* **23**, 865–867 (2016).
16. Gutsche, I. *et al.* Secreted dengue virus nonstructural protein NS1 is an atypical barrel-shaped high-density lipoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **108**, 8003–8008 (2011).
17. Xia, H. *et al.* An evolutionary NS1 mutation enhances Zika virus evasion of host interferon induction. *Nature Communications* **9**, (2018).
18. Liu, Y. *et al.* Evolutionary enhancement of Zika virus infectivity in *Aedes aegypti* mosquitoes. *Nature* **545**, 482–486 (2017).
19. Leung, J. Y. *et al.* Role of Nonstructural Protein NS2A in Flavivirus Assembly. *Journal of Virology* **82**, 4731–4741 (2008).
20. Yoon, K. J. *et al.* Zika-Virus-Encoded NS2A Disrupts Mammalian Cortical Neurogenesis by Degrading Adherens Junction Proteins. *Cell Stem Cell* **21**, 349–358.e6 (2017).

21. Lin, K.-H. *et al.* Dengue Virus NS2B/NS3 Protease Inhibitors Exploiting the Prime Side. *J Virol* **91**, e00045-17 (2017).
22. Chambers, T. J., Nestorowicz, a & Rice, C. M. Mutagenesis of the yellow fever virus NS2B/3 cleavage site: determinants of cleavage site specificity and effects on polyprotein processing and viral replication. *Journal of virology* **69**, 1600–1605 (1995).
23. Gruba, N. *et al.* Substrate profiling of Zika virus NS2B-NS3 protease. *FEBS Letters* **590**, 3459–3468 (2016).
24. Miller, S., Kastner, S., Krijnse-Locker, J., Bühler, S. & Bartenschlager, R. The non-structural protein 4A of dengue virus is an integral membrane protein inducing membrane alterations in a 2K-regulated manner. *Journal of Biological Chemistry* **282**, 8873–8882 (2007).
25. Muñoz-jordán, J. L. *et al.* Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses Inhibition of Alpha / Beta Interferon Signaling by the NS4B Protein of Flaviviruses. *Journal of virology* **79**, 8004–8013 (2005).
26. Liang, Q. *et al.* Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* **19**, 663–671 (2016).
27. Grant, A. *et al.* Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type i Interferon Signaling. *Cell Host and Microbe* **19**, 882–890 (2016).
28. Zhao, Z. *et al.* Nuclear localization of Zika virus NS5 contributes to suppression of type I interferon production and response. *J Gen Virol* **102**, (2021).
29. Mlakar, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. *The New England journal of medicine* **374**, 951–8 (2016).
30. Calvet, G. *et al.* Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *The Lancet Infectious Diseases* **16**, 653–660 (2016).
31. Adibi, J. J., Marques, E. T. A., Cartus, A. & Beigi, R. H. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *Lancet* **387**, 1587–1590 (2016).
32. Ventura, C. V., Maia, M., Bravo-Filho, V., Góis, A. L. & Belfort, R. Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. *The Lancet* **387**, 228 (2016).
33. Miner, J. J. *et al.* Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* 1–11 (2016) doi:10.1016/j.cell.2016.05.008.
34. Li, C. *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 1–7 (2016) doi:10.1016/j.stem.2016.04.017.
35. Cugola, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 1–15 (2016) doi:10.1038/nature18296.
36. Higa, L. M., Trindade, P., Delvecchio, R., Tanuri, A. & Rehen, S. K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **352**, 33–36 (2016).
37. Qian, X. *et al.* Brain-Region-Specific Organoids Using Mini- bioreactors for Modeling ZIKV Exposure Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. *Cell* **165**, 1238–1254 (2016).
38. Shi, Y. *et al.* Vertical Transmission of the Zika Virus Causes Neurological Disorders in Mouse Offspring. *Scientific Reports* **8**, 1–14 (2018).
39. Osuna, C. E. *et al.* Zika viral dynamics and shedding in rhesus and cynomolgus macaques. *Nature Medicine* **22**, 1448–1455 (2016).
40. Dudley, D. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. *Nature Communications* **7**, 1–9 (2016).
41. Aid, M. *et al.* Zika Virus Persistence in the Central Nervous System and Lymph Nodes of Rhesus Monkeys. *Cell* **169**, 610-620.e14 (2017).



42. Coffey, L. L. *et al.* Intraamniotic Zika virus inoculation of pregnant rhesus macaques produces fetal neurologic disease. *Nature Communications* **9**, 2414 (2018).
43. Martinot, A. J. *et al.* Fetal Neuropathology in Zika Virus-Infected Pregnant Female Rhesus Monkeys. *Cell* **173**, 1111-1122.e10 (2018).
44. Hirsch, A. J. *et al.* Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. *Nature Communications* **9**, (2018).
45. Nem de Oliveira Souza, I. *et al.* Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Science Translational Medicine* **10**, eaar2749 (2018).
46. Mavigner, M. *et al.* Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. *Sci. Transl. Med* **10**, 1–16 (2018).
47. Dossi, E., Vasile, F. & Rouach, N. Human astrocytes in the diseased brain. *Brain Res Bull* **136**, 139–156 (2018).
48. Stefanik, M. *et al.* Characterisation of Zika virus infection in primary human astrocytes. *BMC Neuroscience* **19**, 1–8 (2018).
49. Potokar, M., Jorgačevski, J. & Zorec, R. Astrocytes in Flavivirus Infections. *Int J Mol Sci* **20**, 691 (2019).
50. DeAzevedo, L. C. *et al.* Cortical radial glial cells in human fetuses: Depth-correlated transformation into astrocytes. *Journal of Neurobiology* **55**, 288–298 (2003).
51. Hansen, D. V., Lui, J. H., Parker, P. R. L. & Kriegstein, A. R. Neurogenic radial glia in the outer subventricular zone of human neocortex. *Nature* **464**, 554–561 (2010).
52. Sher, A. A., Glover, K. K. M. & Coombs, K. M. Zika virus infection disrupts astrocytic proteins involved in synapse control and axon guidance. *Frontiers in Microbiology* **10**, 1–20 (2019).
53. Jorgačevski, J. *et al.* ZIKV Strains Differentially Affect Survival of Human Fetal Astrocytes versus Neurons and Traffic of ZIKV-Laden Endocytotic Compartments. *Scientific Reports* **9**, 1–14 (2019).
54. Rasmussen, S. A., Jamieson, D. J., Honein, M. A. & Petersen, L. R. Zika Virus and Birth Defects — Reviewing the Evidence for Causality. *New England Journal of Medicine* 1–7 (2016) doi:10.1056/NEJMSr1604338.
55. França, G. V. A. *et al.* Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *The Lancet* **388**, 891–897 (2016).
56. Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology* **89**, 8880–96 (2015).
57. Meertens, L. *et al.* The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host and Microbe* **12**, 544–557 (2012).
58. Chen, H.-W. *et al.* The roles of IRF-3 and IRF-7 in innate antiviral immunity against dengue virus. *J Immunol* **191**, 4194–4201 (2013).
59. MacMicking, J. D. Interferon-inducible effector mechanisms in cell-autonomous immunity. *Nat Rev Immunol* **12**, 367–382 (2012).
60. Yockey, L. J. *et al.* Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol* **3**, eaao1680 (2018).
61. Meertens, L. *et al.* The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host and Microbe* **12**, 544–557 (2012).
62. Hunt, C. L., Kolokoltsov, A. A., Davey, R. A. & Maury, W. The Tyro3 Receptor Kinase Axl Enhances Macropinocytosis of Zaire Ebolavirus. *J Biol Chem* **286**, 334–347 (2011).
63. Hamel, R. *et al.* Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of virology*

- 89, JVI.00354-15- (2015).
64. Schmid, E. T. *et al.* AXL receptor tyrosine kinase is required for T cell priming and antiviral immunity. *eLife* **5**, 1–18 (2016).
65. Carrera Silva, E. A. *et al.* T cell-derived protein S engages TAM receptor signaling in dendritic cells to control the magnitude of the immune response. *Immunity* **39**, 160–170 (2013).
66. Lemke, G. Biology of the TAM receptors. *Cold Spring Harbor perspectives in biology* **5**, (2013).
67. Silva-Filho, J. L. *et al.* Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. *Brain Behav Immun* **97**, 260–274 (2021).
68. Rensing, L. E. *et al.* IFN Signaling EBV MicroRNA BART16 Suppresses Type I EBV MicroRNA BART16 Suppresses Type I IFN Signaling. *The Journal of Immunology* (2017) doi:10.4049/jimmunol.1501605.
69. Axtell, M. J., Westholm, J. O. & Lai, E. C. Vive la différence: Biogenesis and evolution of microRNAs in plants and animals. *Genome Biology* **12**, 1–13 (2011).
70. Bartel, D. P., Lee, R. & Feinbaum, R. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function Genomics : The miRNA Genes. **116**, 281–297 (2004).
71. Baltimore, D., Boldin, M. P., O’Connell, R. M., Rao, D. S. & Taganov, K. D. MicroRNAs: new regulators of immune cell development and function. *Nat Immunol* **9**, 839–845 (2008).
72. Kim, V. N., Han, J. & Siomi, M. C. Biogenesis of small RNAs in animals. *Nat Rev Mol Cell Biol* **10**, 126–139 (2009).
73. Friedman, R. C., Farh, K. K. H., Burge, C. B. & Bartel, D. P. Most mammalian mRNAs are conserved targets of microRNAs. *Genome Research* **19**, 92–105 (2009).
74. Lujambio, A. & Lowe, S. W. The microcosmos of cancer. *Nature* **482**, 347–355 (2012).
75. Lee, R. C., Feinbaum, R. L. & Ambros, V. The *C. elegans* heterochronic gene *lin-4* encodes small RNAs with antisense complementarity to *lin-14*. *Cell* **75**, 843–854 (1993).
76. Lee, Y. *et al.* The nuclear RNase III Drosha initiates microRNA processing. *Nature* **425**, 415–419 (2003).
77. Schwarz, D. S. *et al.* Asymmetry in the assembly of the RNAi enzyme complex. *Cell* **115**, 199–208 (2003).
78. Denli, A. M., Tops, B. B. J., Plasterk, R. H. A., Ketting, R. F. & Hannon, G. J. Processing of primary microRNAs by the Microprocessor complex. *Nature* **432**, 231–235 (2004).
79. Gregory, R. I. *et al.* The Microprocessor complex mediates the genesis of microRNAs. *Nature* **432**, 235–240 (2004).
80. Bohnsack, M. T., Czaplinski, K. & Gorlich, D. Exportin 5 is a RanGTP-dependent dsRNA-binding protein that mediates nuclear export of pre-miRNAs. *RNA* **10**, 185–191 (2004).
81. Rodriguez, M. S., Dargemont, C. & Stutz, F. Nuclear export of RNA. *Biology of the Cell* **96**, 639–655 (2004).
82. Okada, C. *et al.* A high-Resolution structure of the pre-microRNA nuclear export machinery. *Science* **326**, 1275–1279 (2009).
83. Förstemann, K. *et al.* Normal microRNA maturation and germ-line stem cell maintenance requires loquacious, a double-stranded RNA-binding domain protein. *PLoS Biology* **3**, 1187–1201 (2005).
84. Fu, Q. & Yuan, Y. A. Structural insights into RISC assembly facilitated by dsRNA-binding domains of human RNA helicase A (DHX9). *Nucleic Acids Research* **41**, 3457–3470 (2013).
85. Chendrimada, T. P. *et al.* TRBP recruits the Dicer complex to Ago2 for microRNA

- processing and gene silencing. *Nature* **436**, 740–744 (2005).
86. Khvorova, A., Reynolds, A. & Jayasena, S. D. Erratum: Functional siRNAs and miRNAs Exhibit Strand Bias (Cell 115 (209-216)). *Cell* **115**, 505 (2003).
87. Wang, B. *et al.* Distinct passenger strand and mRNA cleavage activities of human Argonaute proteins. *Nat Struct Mol Biol* **16**, 1259–1266 (2009).
88. Bartel, D. P. MicroRNA Target Recognition and Regulatory Functions. *Cell* **136**, 215–233 (2009).
89. Winter, J., Jung, S., Keller, S., Gregory, R. I. & Diederichs, S. Many roads to maturity: microRNA biogenesis pathways and their regulation. *Nature Cell Biology* **11**, 228–234 (2009).
90. Polonio, C. M. & Peron, J. P. S. ZIKV Infection and miRNA Network in Pathogenesis and Immune Response. *Viruses* **13**, 1992 (2021).
91. Llave, C., Xie, Z., Kasschau, K. D. & Carrington, J. C. Cleavage of Scarecrow-like mRNA targets directed by a class of Arabidopsis miRNA. *Science* **297**, 2053–2056 (2002).
92. Palatnik, J. F. *et al.* Control of leaf morphogenesis by microRNAs. *Nature* **425**, 257–263 (2003).
93. Behm-Ansmant, I. *et al.* mRNA degradation by miRNAs and GW182 requires both CCR4:NOT deadenylase and DCP1:DCP2 decapping complexes. *Genes and Development* **20**, 1885–1898 (2006).
94. Kiriakidou, M. *et al.* An mRNA m7G Cap Binding-like Motif within Human Ago2 Represses Translation. *Cell* **129**, 1141–1151 (2007).
95. Pillai, R. S. *et al.* Molecular biology: Inhibition of translational initiation by let-7 microRNA in human cells. *Science* **309**, 1573–1576 (2005).
96. Mishima, Y. *et al.* Differential Regulation of Germline mRNAs in Soma and Germ Cells by Zebrafish miR-430. *Current Biology* **16**, 2135–2142 (2006).
97. Wakiyama, M., Takimoto, K., Ohara, O. & Yokoyama, S. Let-7 microRNA-mediated mRNA deadenylation and translational repression in a mammalian cell-free system. *Genes and Development* **21**, 1857–1862 (2007).
98. Petersen, C. P., Bordeleau, M. E., Pelletier, J. & Sharp, P. A. Short RNAs repress translation after initiation in mammalian cells. *Molecular Cell* **21**, 533–542 (2006).
99. Bashkirov, V. I., Scherthan, H., Solinger, J. A., Buerstedde, J. M. & Heyer, W. D. A mouse cytoplasmic exoribonuclease (mXRN1p) with preference for G4 tetraplex substrates. *Journal of Cell Biology* **136**, 761–773 (1997).
100. Liu, J. *et al.* A role for the P-body component GW182 in microRNA function. *Nature Cell Biology* **7**, 1161–1166 (2005).
101. Pereira, T. C. *Introdução ao mundo das microRNAs*. vol. 1 (SBG, 2015).
102. Sharma, N., Verma, R., Kumawat, K., Basu, A. & Singh, S. K. miR-146a suppresses cellular immune response during Japanese encephalitis virus JaOArS982 strain infection in human microglial cells. *Journal of Neuroinflammation* **12**, 30 (2015).
103. Pareek, S. *et al.* MiR-155 induction in microglial cells suppresses Japanese encephalitis virus replication and negatively modulates innate immune responses. *Journal of neuroinflammation* **11**, 97 (2014).
104. Garcez, P. P. *et al.* Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Scientific Reports* **7**, 40780 (2017).
105. McLean, E., Bhattarai, R., Hughes, B. W., Mahalingam, K. & Bagasra, O. Computational identification of mutually homologous Zika virus miRNAs that target microcephaly genes. *Libyan Journal of Medicine* **12**, 1304505 (2017).
106. Bolger, A. M., Lohse, M. & Usadel, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina

- sequence data. *Bioinformatics* **30**, 2114–2120 (2014).
107. Simpson, J. T. & Durbin, R. Efficient de novo assembly of large genomes using compressed data structures. *Genome Res* **22**, 549–556 (2012).
108. Kim, D., Paggi, J. M., Park, C., Bennett, C. & Salzberg, S. L. Graph-based genome alignment and genotyping with HISAT2 and HISAT-genotype. *Nat Biotechnol* **37**, 907–915 (2019).
109. Baruzzo, G. *et al.* Simulation-based comprehensive benchmarking of RNA-seq aligners. *Nat Methods* **14**, 135–139 (2017).
110. Anders, S., Pyl, P. T. & Huber, W. HTSeq—a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* **31**, 166–169 (2015).
111. Love, M. I., Huber, W. & Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol* **15**, 550 (2014).
112. Mi, H. *et al.* Protocol Update for large-scale genome and gene function analysis with the PANTHER classification system (v.14.0). *Nat Protoc* **14**, 703–721 (2019).
113. Lewis, B. P., Shih, I., Jones-Rhoades, M. W., Bartel, D. P. & Burge, C. B. Prediction of Mammalian MicroRNA Targets. *Cell* **115**, 787–798 (2003).
114. Kertesz, M., Iovino, N., Unnerstall, U., Gaul, U. & Segal, E. The role of site accessibility in microRNA target recognition. *Nature Genetics* **39**, 1278–1284 (2007).
115. Betel, D., Koppal, A., Agius, P., Sander, C. & Leslie, C. Comprehensive modeling of microRNA targets predicts functional non-conserved and non-canonical sites. (2010).
116. Riffo-Campos, Á. L., Riquelme, I. & Brebi-Mieville, P. Tools for sequence-based miRNA target prediction: What to choose? *International Journal of Molecular Sciences* **17**, (2016).
117. Retallack, H. *et al.* Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**, 14408–14413 (2016).
118. Ojha, C. R. *et al.* Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. *PLOS ONE* **14**, e0208543 (2019).
119. Hardwick, L. J. A. & Philpott, A. Multi-site phosphorylation regulates NeuroD4 activity during primary neurogenesis: a conserved mechanism amongst proneural proteins. *Neural Development* **10**, 15 (2015).
120. Masserdotti, G. *et al.* Transcriptional Mechanisms of Proneural Factors and REST in Regulating Neuronal Reprogramming of Astrocytes. *Cell Stem Cell* **17**, 74–88 (2015).
121. Yuan, K., Ai, W.-B., Wan, L.-Y., Tan, X. & Wu, J.-F. The miR-290-295 cluster as multi-faceted players in mouse embryonic stem cells. *Cell & Bioscience* **7**, 38 (2017).
122. Rothhammer, V. & Quintana, F. J. The aryl hydrocarbon receptor: an environmental sensor integrating immune responses in health and disease. *Nat Rev Immunol* **19**, 184–197 (2019).
123. Shi, M. *et al.* Functional Dissection of pri-miR-290~295 in Dgcr8 Knockout Mouse Embryonic Stem Cells. *Int J Mol Sci* **20**, E4345 (2019).
124. Gao, Z., Zhu, X. & Dou, Y. The miR-302/367 cluster: a comprehensive update on its evolution and functions. *Open Biol* **5**, 150138 (2015).
125. Wu, S., Aksoy, M., Shi, J. & Houbaviy, H. B. Evolution of the miR-290-295/miR-371-373 cluster family seed repertoire. *PLoS One* **9**, e108519 (2014).
126. Barroso-delJesus, A. *et al.* Embryonic stem cell-specific miR302-367 cluster: human gene structure and functional characterization of its core promoter. *Mol Cell Biol* **28**, 6609–6619 (2008).
127. Polonio, C. M. *et al.* microRNAs Control Antiviral Immune Response, Cell Death and Chemotaxis Pathways in Human Neuronal Precursor Cells (NPCs) during Zika Virus Infection.

*Int J Mol Sci* **23**, 10282 (2022).

128. Idichi, T., Seki, N., Kurahara, H., Fukuhisa, H. & Toda, H. Involvement of anti-tumor miR-124-3p and its targets in the pathogenesis of pancreatic ductal adenocarcinoma : direct regulation of ITGA3 and ITGB1 by miR-124-3p. *9*, 28849–28865 (2018).
129. Li, X. *et al.* Downregulation of miR-218-5p promotes invasion of oral squamous cell carcinoma cells via activation of CD44-ROCK signaling. *Biomedicine & Pharmacotherapy* **106**, 646–654 (2018).
130. Paul, S. & Brahma, D. An Integrated Approach for Identification of Functionally Similar MicroRNAs in Colorectal Cancer. *IEEE/ACM Transactions on Computational Biology and Bioinformatics* **5963**, 1–1 (2017).
131. Beltrami, C. *et al.* Association of Elevated Urinary miR-126, miR-155, and miR-29b with Diabetic Kidney Disease. *The American Journal of Pathology* (2018) doi:10.1016/j.ajpath.2018.06.006.
132. Press, D. Icariside II ameliorates endothelial dysfunction by regulating the MAPK pathway via miR-126 / SPRED1 in diabetic human cavernous endothelial cells. 1743–1751 (2018).
133. Keller, A. *et al.* Multiple Sclerosis: MicroRNA Expression Profiles Accurately Differentiate Patients with Relapsing-Remitting Disease from Healthy Controls. *PLoS ONE* **4**, (2009).
134. Zhu, E. *et al.* miR-20b suppresses Th17 differentiation and the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis by targeting ROR $\gamma$ t and STAT3. *Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)* **192**, 5599–609 (2014).
135. Murugaiyan, G. *et al.* MicroRNA-21 promotes Th17 differentiation and mediates experimental autoimmune encephalomyelitis. *Journal of Clinical Investigation* **125**, 1069–1080 (2015).
136. Heiss, B. L., Maximova, O. A., Thach, D. C., Speicher, J. M. & Pletnev, A. G. MicroRNA Targeting of Neurotropic Flavivirus: Effective Control of Virus Escape and Reversion to Neurovirulent Phenotype. *Journal of Virology* **86**, 5647–5659 (2012).
137. Diosa-Toro, M. *et al.* MicroRNA profiling of human primary macrophages exposed to dengue virus identifies miRNA-3614-5p as antiviral and regulator of ADAR1 expression. *PLoS Neglected Tropical Diseases* **11**, 1–24 (2017).
138. Mihnea, D., Baoqing, C., Xiao, F. & George, A. C. Key questions about the checkpoint blockade-are microRNAs an answer? *Cancer Biology & Medicine* **15**, 103 (2018).
139. Zhou, M. *et al.* miRNA29 Promotes Viral Replication During Early Stage of PRRSV Infection *In Vitro*. *DNA and Cell Biology* **35**, 636–642 (2016).
140. Kanokudom, S. *et al.* miR-21 promotes dengue virus serotype 2 replication in HepG2 cells. *Antiviral Research* **142**, 169–177 (2017).
141. Ashraf, U. *et al.* MicroRNA-19b-3p Modulates Japanese Encephalitis Virus-Mediated Inflammation via Targeting RNF11. *Journal of Virology* **90**, 4780–4795 (2016).
142. Zeng, J. *et al.* The Zika Virus Capsid Disrupts Corticogenesis by Suppressing Dicer Activity and miRNA Biogenesis. *Cell Stem Cell* **27**, 618-632.e9 (2020).
143. Bhagat, R. *et al.* Zika virus E protein alters the properties of human fetal neural stem cells by modulating microRNA circuitry. *Cell Death and Differentiation* **25**, 1837–1854 (2018).
144. Islam, Md. S., Khan, Md. A., Murad, Md. W., Karim, M. & Islam, A. B. M. Md. K. 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* 1–11 (2019) doi:10.1002/jmv.25505.

145. Xia, W. *et al.* MicroRNA - 32 promotes cell proliferation , migration and suppresses apoptosis in breast cancer cells by targeting FBXW7. *Cancer Cell International* 1–11 (2017) doi:10.1186/s12935-017-0383-0.
146. Cao, J. *et al.* Extracellular vesicle miR-32 derived from macrophage promotes arterial calcification in mice with type 2 diabetes via inhibiting VSMC autophagy. *J Transl Med* **20**, 307 (2022).
147. Giraldo, M. I. *et al.* Envelope protein ubiquitination drives entry and pathogenesis of Zika virus. *Nature* **585**, 414–419 (2020).
148. Reinhart, B. J. *et al.* The 21-nucleotide let-7 RNA regulates developmental timing in *Caenorhabditis elegans*. *Nature* **403**, 901–906 (2000).
149. de Almeida, B. C. *et al.* Let-7 miRNA's Expression Profile and Its Potential Prognostic Role in Uterine Leiomyosarcoma. *Cells* **8**, 1452 (2019).
150. Melton, C., Judson, R. L. & Blelloch, R. Opposing microRNA families regulate self-renewal in mouse embryonic stem cells. *Nature* **463**, 621–626 (2010).
151. Büssing, I., Slack, F. J. & Großhans, H. let-7 microRNAs in development, stem cells and cancer. *Trends in Molecular Medicine* **14**, 400–409 (2008).
152. Xiao, S. *et al.* MicroRNA miR-24-3p promotes porcine reproductive and respiratory syndrome virus replication through suppression of heme oxygenase-1 expression. *J Virol* **89**, 4494–4503 (2015).
153. Wang, L. *et al.* Inhibition of replication of porcine reproductive and respiratory syndrome virus by hemin is highly dependent on heme oxygenase-1, but independent of iron in MARC-145 cells. *Antiviral Research* **105**, 39–46 (2014).
154. Zhang, Q. *et al.* MicroRNA-23 inhibits PRRSV replication by directly targeting PRRSV RNA and possibly by upregulating type I interferons. *Virology* **450–451**, 182–195 (2014).
155. Shukla, A., Rastogi, M. & Singh, S. K. Zika virus NS1 suppresses the innate immune responses via miR-146a in human microglial cells. *Int J Biol Macromol* **193**, 2290–2296 (2021).
156. Azouz, F., Arora, K., Krause, K., Nerurkar, V. R. & Kumar, M. Integrated MicroRNA and mRNA Profiling in Zika Virus-Infected Neurons. *Viruses* **11**, E162 (2019).
157. Kałużna, E. M. MicroRNA-155 and microRNA-196b: promising biomarkers in hepatitis C virus infection? *Rev Med Virol* **24**, 169–185 (2014).
158. Wang, P. *et al.* Two cellular microRNAs, miR-196b and miR-1290, contribute to HIV-1 latency. *Virology* **486**, 228–238 (2015).
159. Tian, G.-P. *et al.* MicroRNA-467b targets LPL gene in RAW 264.7 macrophages and attenuates lipid accumulation and proinflammatory cytokine secretion. *Biochimie* **94**, 2749–2755 (2012).
160. Li, X., Liu, Y., Mu, Q., Tian, J. & Yu, H. MiR-290 family maintains developmental potential by targeting p21 in mouse preimplantation embryos. *Biology of Reproduction* **106**, 425–440 (2022).
161. Lichner, Z. *et al.* The miR-290-295 cluster promotes pluripotency maintenance by regulating cell cycle phase distribution in mouse embryonic stem cells. *Differentiation* **81**, 11–24 (2011).
162. Cao, Y. *et al.* miR-290/371-Mbd2-Myc circuit regulates glycolytic metabolism to promote pluripotency. *The EMBO Journal* **34**, 609–623 (2015).
163. Judson, R. L., Babiarz, J. E., Venere, M. & Blelloch, R. Embryonic stem cell-specific microRNAs promote induced pluripotency. *Nat Biotechnol* **27**, 459–461 (2009).
164. Liu, J., Bain, L. J. & Carolina, S. Arsenic Induces Members of the mmu-miR-466-669 Cluster Which Reduces NeuroD1 Expression. **162**, 64–78 (2018).

165. Gratton, R., Agrelli, A., Tricarico, P. M., Brandão, L. & Crovella, S. Autophagy in Zika Virus Infection: A Possible Therapeutic Target to Counteract Viral Replication. *International Journal of Molecular Sciences* **20**, 1048 (2019).
166. Chiramel, A. I. & Best, S. M. Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis. *Virus Research* **254**, 34–40 (2018).
167. Klionsky, D. J. & Emr, S. D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation. *Science* **290**, 1717–1721 (2000).
168. Peng, H. *et al.* Zika Virus Induces Autophagy in Human Umbilical Vein Endothelial Cells. *Viruses* **10**, E259 (2018).
169. Abernathy, E. *et al.* Differential and convergent utilization of autophagy components by positive-strand RNA viruses. *PLoS Biology* **17**, e2006926 (2019).
170. Kabeya, Y. *et al.* LC3, a mammalian homologue of yeast Apg8p, is localized in autophagosomal membranes after processing. *EMBO J* **19**, 5720–5728 (2000).
171. Runwal, G. *et al.* LC3-positive structures are prominent in autophagy-deficient cells. *Sci Rep* **9**, 10147 (2019).
172. Klionsky, D. J. *et al.* Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy in higher eukaryotes. *Autophagy* **4**, 151–175 (2008).
173. He, Z. *et al.* Neural progenitor cell pyroptosis contributes to Zika virus-induced brain atrophy and represents a therapeutic target. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **117**, 23869–23878 (2020).
174. Cao, B., Parnell, L. A., Diamond, M. S. & Mysorekar, I. U. Inhibition of autophagy limits vertical transmission of Zika virus in pregnant mice. *J Exp Med* **214**, 2303–2313 (2017).
175. Huang, L. *et al.* High-content screening of diterpenoids from *Isodon* species as autophagy modulators and the functional study of their antiviral activities. *Cell Biol Toxicol* **37**, 695–713 (2021).
176. Sun, P. *et al.* A mosquito salivary protein promotes flavivirus transmission by activation of autophagy. *Nat Commun* **11**, 260 (2020).
177. Ozato, K., Shin, D.-M., Chang, T.-H. & Morse, H. C. TRIM family proteins and their emerging roles in innate immunity. *Nat Rev Immunol* **8**, 849–860 (2008).
178. Mandell, M. A. *et al.* TRIM proteins regulate autophagy and can target autophagic substrates by direct recognition. *Dev Cell* **30**, 394–409 (2014).
179. Di Rienzo, M., Romagnoli, A., Antonioli, M., Piacentini, M. & Fimia, G. M. TRIM proteins in autophagy: selective sensors in cell damage and innate immune responses. *Cell Death Differ* **27**, 887–902 (2020).
180. Wan, T., Li, X. & Li, Y. The role of TRIM family proteins in autophagy, pyroptosis, and diabetes mellitus. *Cell Biology International* **45**, 913–926 (2021).
181. Lou, J., Wang, Y., Zheng, X. & Qiu, W. TRIM22 regulates macrophage autophagy and enhances *Mycobacterium tuberculosis* clearance by targeting the nuclear factor-multiplicity  $\kappa$ B/beclin 1 pathway. *J Cell Biochem* **119**, 8971–8980 (2018).
182. Fusco, C. *et al.* TRIM50 regulates Beclin 1 proautophagic activity. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res* **1865**, 908–919 (2018).
183. Wang, M. *et al.* Domain fusion TLR2-4 enhances the autophagy-dependent clearance of *Staphylococcus aureus* in the genetic engineering goat. *Elife* **11**, e78044 (2022).
184. Ling, Y. M. *et al.* Vacuolar and plasma membrane stripping and autophagic elimination of *Toxoplasma gondii* in primed effector macrophages. *J Exp Med* **203**, 2063–2071 (2006).
185. Maric-Biresev, J. *et al.* Loss of the interferon- $\gamma$ -inducible regulatory immunity-related GTPase (IRG), *Irgm1*, causes activation of effector IRG proteins on lysosomes, damaging

- lysosomal function and predicting the dramatic susceptibility of Irgm1-deficient mice to infection. *BMC Biol* **14**, 33 (2016).
186. Xie, F. *et al.* Inhibition of Heat Shock Protein B8 Alleviates Retinal Dysfunction and Ganglion Cells Loss Via Autophagy Suppression in Mouse Axonal Damage. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **63**, 28 (2022).
187. Lin, W.-J. *et al.* Lysosomal targeting of pphafin1 mediated by Rab7 induces autophagosome formation. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **417**, 35–42 (2012).
188. Li, Q.-W. *et al.* SANT, a novel Chinese herbal monomer combination, decreasing tumor growth and angiogenesis via modulating autophagy in heparanase overexpressed triple-negative breast cancer. *J Ethnopharmacol* **266**, 113430 (2021).
189. Dai, Y. & Grant, S. BCL2L11/Bim as a dual-agent regulating autophagy and apoptosis in drug resistance. *Autophagy* **11**, 416–418 (2015).
190. Chen, Y. L., Xu, Q. P., Guo, F. & Guan, W. H. MicroRNA-302d downregulates TGFBR2 expression and promotes hepatocellular carcinoma growth and invasion. *Experimental and Therapeutic Medicine* **13**, 681–687 (2017).
191. Faherty, N. *et al.* CCN2/CTGF increases expression of miR-302 microRNAs, which target the TGF type II receptor with implications for nephropathic cell phenotypes. *Journal of Cell Science* **125**, 5621–5629 (2012).
192. Baldwin, K. T. & Eroglu, C. Molecular mechanisms of astrocyte-induced synaptogenesis. *Current Opinion in Neurobiology* **45**, 113–120 (2017).
193. Bélanger, M., Allaman, I. & Magistretti, P. J. Brain energy metabolism: Focus on Astrocyte-neuron metabolic cooperation. *Cell Metabolism* **14**, 724–738 (2011).
194. Cabezas, R. *et al.* Astrocytic modulation of blood brain barrier: Perspectives on Parkinson's disease. *Frontiers in Cellular Neuroscience* **8**, 1–11 (2014).
195. Kozak, R. A. *et al.* MicroRNA and mRNA dysregulation in astrocytes infected with Zika virus. *Viruses* **9**, 1–18 (2017).
196. Joo, M. S., Lee, C. G., Koo, J. H. & Kim, S. G. miR-125b transcriptionally increased by Nrf2 inhibits AhR repressor, which protects kidney from cisplatin-induced injury. *Cell Death Dis* **4**, e899 (2013).
197. Giovannoni, F. *et al.* AHR is a Zika virus host factor and a candidate target for antiviral therapy. *Nat Neurosci* **23**, 939–951 (2020).
198. Wnuk, A. *et al.* Autophagy-related neurotoxicity is mediated via AHR and CAR in mouse neurons exposed to DDE. *Science of The Total Environment* **742**, 140599 (2020).
199. Giovannoni, F. *et al.* AHR signaling is induced by infection with coronaviruses. *Nat Commun* **12**, 5148 (2021).
200. Torti, M. F., Giovannoni, F., Quintana, F. J. & García, C. C. The Aryl Hydrocarbon Receptor as a Modulator of Anti-viral Immunity. *Frontiers in Immunology* **12**, (2021).
201. Dai, J. *et al.* MiR-137 attenuates spinal cord injury by modulating NEUROD4 through reducing inflammation and oxidative stress. *Eur Rev Med Pharmacol Sci* **22**, 1884–1890 (2018).
202. Gu, E. *et al.* LncRNA H19 Regulates Lipopolysaccharide (LPS)-Induced Apoptosis and Inflammation of BV2 Microglia Cells Through Targeting miR-325-3p/NEUROD4 Axis. *J Mol Neurosci* **71**, 1256–1265 (2021).
203. Wang, J. & Liu, G. Protective effect of microRNA-340-5p against oxygen-glucose deprivation/reperfusion in PC12 cells through targeting neuronal differentiation 4. *Mol Med Rep* **22**, 964–974 (2020).
204. Yang, L., Ge, D., Chen, X., Jiang, C. & Zheng, S. miRNA-544a Regulates the Inflammation



- of Spinal Cord Injury by Inhibiting the Expression of NEUROD4. *Cell Physiol Biochem* **51**, 1921–1931 (2018).
205. Mk, J. *et al.* MicroRNA 486 is a potentially novel target for the treatment of spinal cord injury. *Brain : a journal of neurology* **135**, (2012).
206. Tutukova, S., Tarabykin, V. & Hernandez-Miranda, L. R. The Role of Neurod Genes in Brain Development, Function, and Disease. *Frontiers in Molecular Neuroscience* **14**, (2021).
207. A new DNA binding and dimerization motif in immunoglobulin enhancer binding, daughterless, MyoD, and myc proteins - PubMed. <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/2493990/>.
208. Bayer, S. & Altaman, J. *The Human Brain During the Early First Trimester*. vol. 1 (Boca Raton).
209. Bertrand, N., Castro, D. S. & Guillemot, F. Proneural genes and the specification of neural cell types. *Nat Rev Neurosci* **3**, 517–530 (2002).
210. Mattar, P. *et al.* Basic Helix-Loop-Helix Transcription Factors Cooperate To Specify a Cortical Projection Neuron Identity. *Mol Cell Biol* **28**, 1456–1469 (2008).
211. Bormuth, I. *et al.* Neuronal basic helix-loop-helix proteins Neurod2/6 regulate cortical commissure formation before midline interactions. *J Neurosci* **33**, 641–651 (2013).
212. Wu, S.-X. *et al.* Pyramidal neurons of upper cortical layers generated by NEX-positive progenitor cells in the subventricular zone. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **102**, 17172–17177 (2005).
213. Bernstein, E. *et al.* Dicer is essential for mouse development. **35**, 215–217 (2003).
214. Petri, R., Malmevik, J., Fasching, L., Åkerblom, M. & Jakobsson, J. miRNAs in brain development. *Experimental Cell Research* (2013) doi:10.1016/j.yexcr.2013.09.022.
215. Bian, S. *et al.* Report MicroRNA Cluster miR-17-92 Regulates Neural Stem Cell Expansion and Transition to Intermediate Progenitors in the Developing Mouse Neocortex. *CellReports* **3**, 1398–1406 (2013).
216. Åkerblom, M. *et al.* by microRNA-9. (2013) doi:10.1038/ncomms2801.
217. Delaloy, C. *et al.* Article MicroRNA-9 Coordinates Proliferation and Migration of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Progenitors. *Stem Cell* **6**, 323–335 (2010).
218. Ghosh, T. *et al.* MicroRNAs Establish Robustness and Adaptability of a Critical Gene Network to Regulate Progenitor Fate Decisions during Cortical Neurogenesis. *Cell Reports* **7**, 1779–1788 (2014).
219. Hazin, A. N. *et al.* Computed Tomographic Findings in Microcephaly Associated with Zika Virus. *New England Journal of Medicine* **374**, 2193–2195 (2016).
220. Li, Z. & Nagy, P. D. Diverse roles of host RNA-binding proteins in RNA virus replication. *RNA Biol* **8**, 305–315 (2011).
221. Chavali, P. L. *et al.* Neurodevelopmental protein Musashi-1 interacts with the Zika genome and promotes viral replication. *Science* **357**, 83–88 (2017).
222. Castro, F. L. *et al.* MicroRNAs 145 and 148a Are Upregulated During Congenital Zika Virus Infection. *ASN Neuro* **11**, 1759091419850983 (2019).
223. Chen, S.-T. *et al.* NLRP12 Regulates Anti-viral RIG-I Activation via Interaction with TRIM25. *Cell Host & Microbe* **25**, 602-616.e7 (2019).
224. Li, X. *et al.* A Novel Role for the Regulatory Nod-Like Receptor NLRP12 in Anti-Dengue Virus Response. *Front Immunol* **12**, 744880 (2021).
225. Hornick, E. E. *et al.* Nlrp12 Mediates Adverse Neutrophil Recruitment during Influenza Virus Infection. *J Immunol* **200**, 1188–1197 (2018).
226. Zanluqui, N. G. *et al.* Zika Virus Infection of Murine and Human Neutrophils and their

- Function as Trojan Horses to the Placenta. 2021.09.14.460378 Preprint at <https://doi.org/10.1101/2021.09.14.460378> (2021).
227. Krueger, B. J. *et al.* LARP7 is a stable component of the 7SK snRNP while P-TEFb, HEXIM1 and hnRNP A1 are reversibly associated. *Nucleic Acids Res* **36**, 2219–2229 (2008).
228. Stoszko, M. *et al.* Gliotoxin, identified from a screen of fungal metabolites, disrupts 7SK snRNP, releases P-TEFb, and reverses HIV-1 latency. *Sci Adv* **6**, eaba6617 (2020).
229. Wang, W., Xia, X., Mao, L. & Wang, S. The CCAAT/Enhancer-Binding Protein Family: Its Roles in MDSC Expansion and Function. *Frontiers in Immunology* **10**, (2019).
230. Yang, X. *et al.* Ginsenoside Rg3 inhibits colorectal tumor growth via down-regulation of C/EBP $\beta$ /NF- $\kappa$ B signaling. *Biomed Pharmacother* **96**, 1240–1245 (2017).
231. Zou, J. *et al.* C/EBP $\beta$  knockdown protects cardiomyocytes from hypertrophy via inhibition of p65-NF $\kappa$ B. *Mol Cell Endocrinol* **390**, 18–25 (2014).
232. Stein, B. & Baldwin, A. S. Distinct mechanisms for regulation of the interleukin-8 gene involve synergism and cooperativity between C/EBP and NF-kappa B. *Mol Cell Biol* **13**, 7191–7198 (1993).
233. Greaves, R. F. & Mocarski, E. S. Defective growth correlates with reduced accumulation of a viral DNA replication protein after low-multiplicity infection by a human cytomegalovirus ie1 mutant. *J Virol* **72**, 366–379 (1998).
234. Prösch, S., Heine, A.-K., Volk, H.-D. & Krüger, D. H. CCAAT/Enhancer-binding Proteins  $\alpha$  and  $\beta$  Negatively Influence the Capacity of Tumor Necrosis Factor  $\alpha$  to Up-regulate the Human Cytomegalovirus IE1/2 Enhancer/Promoter by Nuclear Factor  $\kappa$ B during Monocyte Differentiation \*. *Journal of Biological Chemistry* **276**, 40712–40720 (2001).
235. Paul, D. & Bartenschlager, R. Architecture and biogenesis of plus-strand RNA virus replication factories. *World J Virol* **2**, 32–48 (2013).

## **8. REALIZAÇÕES DURANTE O DOUTORADO**

### **8.1. Artigos publicados durante o doutorado relacionados à tese.**

- 1) **Polonio, CM**, et al. microRNAs control antiviral immune response, cell death and chemotaxis pathways in human neuronal precursor cells (NPCs) during Zika virus infection. **Int. J. Mol. Sci.** 7:23(18):10281, 2022 (**Anexo 2**).
- 2) **Polonio, CM**, Peron, JPS. ZIKV Infection and miRNA Network in Pathogenesis and Immune Response. **Viruses.** 4;13(10), 2021 (**Anexo 3**).
- 3) **Polonio, C.M** et al. Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis.** Sep 15; 23:41. 2017 (**Anexo 4**).
- 4) Giovannoni F, Bosch I, **Polonio CM**, et al. AHR is a Zika virus host factor and a candidate target for antiviral therapy. **Nature Neuroscience.** 23(8):939-951, 2020 (**Anexo 5**).

### **8.2. Artigos publicados durante o doutorado não relacionados à tese.**

- 1) Sanmarco LM, Chao C-C, Yang Y-C, Kenison JE, Li Z, Rone JM, Rejano-Gordillo C, **Polonio CM**, et al. Identification of environmental factors that promote intestinal inflammation. **Nature.** Oct 20, 2022 (**Anexo 6**)
- 2) Borim PA, Mimura LA, Zorzella-Pezavento SF, **Polonio CM**, Peron JPS, Sartori A, Fraga-Silva TF. Effect of rapamycin on MOG-specific cells and LPS-activated microglia: an in vitro approach for screening new therapies for multiple sclerosis. **Journal of Interferon and Cytokine Research.** 42(4):153-160, 2022 (**Anexo 7**).
- 3) De Oliveira LG, Angelo Y, Yamamoto P, Carregari V, Crunfli F, Reis G, Vendramini P, Almeida E, Costa L, Barreto N, Firmino E, Paiva I, Almeida G, Sebolella A, **Polonio CM**, et al. SARS-CoV-2 Infection impacts carbon metabolism and depends on glutamine for replication in Syrian Hamster astrocytes. **Journal of Neurochemistry.** 26;10.1111, 2022 (**Anexo 8**).
- 4) **Manganeli Polonio, Carolina** et al. Murine Endometrial-Derived Mesenchymal Stem Cells Suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis Depending on Indoleamine-2,3-Dioxygenase Expression. **Clinical Science**, V. 135, P. 1065-1082, 2021. **Esse trabalho foi CAPA da revista (Anexo 9)**.
- 5) Sanmarco, LM\*; **Polonio, CM\***; Wheeler, MA\*; Quintana, FJ. Functional immune cell-astrocyte interactions. **Journal Experimental Medicine.** Vol. 218, No. 9, P. 1-11, 2021 (**Anexo 10**).

- 6) Freitas CL, **Polonio CM**, et al. Human Fallopian Tube – Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Th1/Th17 Activation and Migration to Central Nervous System. **Stem Cell Reviews and Reports**. 18(2):609-625, 2021 (**Anexo 11**).
- 7) Silva-Filho JL, de Oliveira LG, Monteiro L, Parise PL, Zanluqui NG, **Polonio CM**, et al. Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice. **Brain Behavior and Immunity**. 97:260-274, 2021 (**Anexo 12**).
- 8) Sanmarco, LM; Wheeler, MA; Gutiérrez-Vázquez, C; **Polonio, CM**; et al. Gut-Licensed IFN $\gamma$ + NK Cells Drive LAMP1+TRAIL+ Anti-Inflammatory Astrocytes. **Nature**, V. Online, P. 1, 2021 (**Anexo 13**).
- 9) Clark, IC; Gutiérrez-Vázquez, C; Wheeler, MA; Li, Z; Rothhammer, V; Linnerbauer, M; Sanmarco, LM; Guo, L; Blain, M; Zandee, SEJ; Chao, CC; Batterman, KV; Schwabenland, M; Lotfy, P; Tejeda-Velarde, A; Hewson, P; **Polonio, CM**; et al. Barcoded Viral Tracing of Single-Cell Interactions in Central Nervous System Inflammation. **Science**, V. 372, P. Eabf1230, 2021 (**Anexo 14**).

### **8.3. Prêmios associados à essa tese.**

- 1) Best Abstract Award at International Experimental Biology and Medicine Conference (IEBMC) Brazil 2022 (**Anexo 15**).
- 2) 24 Prêmio Jovem Talento em Ciências da Vida – Promovido pela Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular e Cytiva. 2021 (**Anexo 16**).
- 3) Special Award on Zika Virus Research, Hispanic Organization of Toxicologists. 2018 (**Anexo 17**).
- 4) Finalista Prêmio BD SBI 2017 (**Anexo 18**).

9. ANEXOS

ANEXO 1



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS  
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira", Butantã, São Paulo, SP - Av. Professor Lineu Prestes, 2415 - ICB III - 05508 000  
CEUA-ICB/USP - Telefone (11) 3091-7733 - e-mail: cep@icb.usp.br

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado "*Avaliação do papel dos microRNAs na imunopatogênese da microcefalia causada pelo Zika vírus em modelos experimentais*", registrado sob o protocolo nº **87/2017**, que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de *Pesquisa Científica*, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle e Experimentação Animal (CONCEA). Ante esta conformidade, o referido projeto foi avaliado e aprovado em **08/08/2017** pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (CEUA-ICB/USP), outorgando esta licença de uso de animais com validade de **4 ano(s)** a partir da data de aprovação.

- Investigador Principal: **Dr.(a.) Jean Pierre Schtzmann Peron**
- Departamento: *Imunologia*
- Membros da Equipe: *Nagela Ghabdan Zanluqui (Pós-graduando), Lilian Gomes de Oliveira (Pós-graduando), Carla Longo de Freitas (Pós-graduando), Wesley Nogueira Brandão (Pós-graduando)*

Ao final do período outorgado por esta licença, o pesquisador responsável deverá encaminhar a esta comissão, até o último dia de validade da atual proposta, *relatório final* de acordo com a Resolução Normativa CONCEA nº 30/2016 - Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA), conforme modelo constante no endereço eletrônico [ww2.icb.usp.br/icb/ceua](http://ww2.icb.usp.br/icb/ceua). Havendo interesse na renovação do projeto, a solicitação deverá ser protocolada pela Secretaria da CEUA-ICB/USP até o último dia de validade da atual proposta. Após esta data uma nova proposta deverá ser encaminhada.

CERTIFICATE

We hereby certify that the project entitled "*Evaluation of the microRNAs role in the immunopathogenesis of microcephaly caused by Zika virus in experimental models*", protocol nº **87/2017**, which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human), for *Scientific Research Purposes*, is in accordance with the provisions of the Law nº 11.794 passed on October 8<sup>th</sup>, 2008, Decree nº 6899 passed on July 15<sup>th</sup>, 2009, and the rules issued by the National Council for Control and Animal Experimentation (CONCEA). According to this legislation, the project was evaluated and approved on **8/8/2017** by the ETHICS COMMITTEE ON ANIMAL USE, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo (CEUA-ICB/USP), and the license for animal use is valid for **4 year(s)** from the date of approval.

- Principal Investigator: **Dr.(a.) Jean Pierre Schtzmann Peron**
- Team members: *Nagela Ghabdan Zanluqui (Graduate Student), Lilian Gomes de Oliveira (Graduate Student), Carla Longo de Freitas (Graduate Student), Wesley Nogueira Brandão (Graduate Student)*

At the end of the period granted by this license, the Principal Investigator must submit a final report of the project to this committee, according to the Rule nº 30 and the Diretriz Brasileira para o Cuidado e a Utilização de Animais em Atividades de Ensino ou de Pesquisa Científica (DBCA) issued by the CONCEA. If a renewal of the project is intended, the request must be submitted to the CEUA-ICB/USP secretary before the expiration of the current proposal. After this date, a new proposal must be prepared.

Espécie/Species	Linhagem/Strain	Sexo/Gender	Idade-Peso/ Age-Weight	Total
<i>Mus musculus</i>	<i>SJL</i>	<i>Fêmea/female</i>	<i>até 5 meses/months</i>	200
	<i>SJL</i>	<i>Macho/male</i>	<i>até 5 meses/months</i>	40

São Paulo, 05 de setembro de 2017.

*Luciane Valéria Sita*  
 Profa. Dra. Luciane Valéria Sita  
 Coordenadora CEUA-ICB/USP



## Article

# microRNAs Control Antiviral Immune Response, Cell Death and Chemotaxis Pathways in Human Neuronal Precursor Cells (NPCs) during Zika Virus Infection

Carolina M. Polonio <sup>1,2</sup>, Patrick da Silva <sup>1,2,†</sup>, Fabiele B. Russo <sup>2,3,†</sup>, Brendo R. N. Hyppolito <sup>1,4</sup>, Nagela G. Zanluqui <sup>1,2,4</sup>, Cecília Benazzato <sup>3</sup>, Patrícia C. B. Beltrão-Braga <sup>2,3</sup>, Sandra M. Muxel <sup>1,2,\*</sup> and Jean Pierre S. Peron <sup>1,2,4,\*</sup>

<sup>1</sup> Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

<sup>2</sup> Scientific Platform Pasteur-USP (SPPU), University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

<sup>3</sup> Disease Modeling Laboratory at Department of Microbiology, Institute of Biomedical Sciences, São Paulo 05508-000, Brazil

<sup>4</sup> Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil

\* Correspondence: sandramuxel@usp.br (S.M.M.); jeanpierre@usp.br (J.P.S.P.)

† These authors contributed equally to this work.



**Citation:** Polonio, C.M.; da Silva, P.; Russo, F.B.; Hyppolito, B.R.N.; Zanluqui, N.G.; Benazzato, C.; Beltrão-Braga, P.C.B.; Muxel, S.M.; Peron, J.P.S. microRNAs Control Antiviral Immune Response, Cell Death and Chemotaxis Pathways in Human Neuronal Precursor Cells (NPCs) during Zika Virus Infection. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 10282. <https://doi.org/10.3390/ijms231810282>

Academic Editor: Romano Regazzi

Received: 7 July 2022

Accepted: 24 August 2022

Published: 7 September 2022

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



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

**Abstract:** Viral infections have always been a serious burden to public health, increasing morbidity and mortality rates worldwide. Zika virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted by the *Aedes aegypti* vector and the causative agent of severe fetal neuropathogenesis and microcephaly. The virus crosses the placenta and reaches the fetal brain, mainly causing the death of neuronal precursor cells (NPCs), glial inflammation, and subsequent tissue damage. Genetic differences, mainly related to the antiviral immune response and cell death pathways greatly influence the susceptibility to infection. These components are modulated by many factors, including microRNAs (miRNAs). MiRNAs are small noncoding RNAs that regulate post-transcriptionally the overall gene expression, including genes for the neurodevelopment and the formation of neural circuits. In this context, we investigated the pathways and target genes of miRNAs modulated in NPCs infected with ZIKV. We observed downregulation of miR-302b, miR-302c and miR-194, whereas miR-30c was upregulated in ZIKV infected human NPCs in vitro. The analysis of a public dataset of ZIKV-infected human NPCs evidenced 262 upregulated and 3 downregulated genes, of which 142 were the target of the aforementioned miRNAs. Further, we confirmed a correlation between miRNA and target genes affecting pathways related to antiviral immune response, cell death and immune cells chemotaxis, all of which could contribute to the establishment of microcephaly and brain lesions. Here, we suggest that miRNAs target gene expression in infected NPCs, directly contributing to the pathogenesis of fetal microcephaly.

**Keywords:** microRNA; ZIKV; inflammation; cell death; chemotaxis

## 1. Introduction

The Zika virus (ZIKV) is an arbovirus from the *Flaviviridae* family with a symmetrical structure, icosahedral nucleocapsid, enveloped and a single-stranded positively oriented RNA genome. It was first isolated in 1947 from the blood of *Rhesus* sp. sentinel monkeys in the Ziika forest in Uganda, Africa. Since then, the clinical relevance was negligible, as it rarely caused human infections in Africa and Asia [1].

However, in the first half of 2015, a generalized epidemic of ZIKV erupted in South and Central America, being the northeast of Brazil the most affected region. Clinicians have noticed a significant increase in the number of serious neurological complications



Review

# ZIKV Infection and miRNA Network in Pathogenesis and Immune Response

Carolina Manganeli Polonio <sup>1,2</sup> and Jean Pierre Schatzmann Peron <sup>1,2,3,\*</sup>

<sup>1</sup> Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo 05508-000, Brazil; cmpolonio@usp.br

<sup>2</sup> Laboratory of Neuroimmunology of Arboviruses, Scientific Platform Pasteur-USP (SPPU), University of São Paulo, São Paulo 05508-020, Brazil

<sup>3</sup> Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo 01246-000, Brazil

\* Correspondence: jeanpierre@usp.br

**Abstract:** Over the years, viral infections have caused severe illness in humans. Zika Virus (ZIKV) is a flavivirus transmitted by mosquito vectors that leads to notable neurological impairment, whose most dramatic impact is the Congenital ZIKV Syndrome (CZS). ZIKV targets neuronal precursor cells leading to apoptosis and further impairment of neuronal development, causing microcephaly, lissencephaly, ventriculomegaly, and calcifications. Several regulators of biological processes are involved in CZS development, and in this context, microRNAs (miRNAs) seem to have a fundamental role. miRNAs are important regulators of protein translation, as they form the RISC silencing complex and interact with complementary mRNA target sequences to further post-transcriptional repression. In this context, little is known about their participation in the pathogenesis of viral infections. In this review, we discuss how miRNAs could relate to ZIKV and other flavivirus infections.

**Keywords:** microRNAs; ZIKV; flavivirus; viral infection



**Citation:** Polonio, C.M.; Peron, J.P.S. ZIKV Infection and miRNA Network in Pathogenesis and Immune Response. *Viruses* **2021**, *13*, 1992. <https://doi.org/10.3390/v13101992>

Academic Editors: Deborah H. Fuller and Heidi Drummer

Received: 15 August 2021  
Accepted: 28 September 2021  
Published: 4 October 2021

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



**Copyright:** © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

## 1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is an arbovirus of the Flaviviridae family first isolated in 1947 from sentinel *Rhesus* sp. monkeys and *Aedes africanus* mosquitoes at the Ziika forest in Uganda, Africa [1]. ZIKV has a symmetrical structure, enveloped icosahedral nucleocapsid, and a 10 Kb (+) single-stranded RNA genome that encodes three structural proteins: Capsid (C), Pre-membrane (Pr-M), and Envelope (Env), and seven non-structural proteins: NS1, NS2a-2b, NS3, NS4a-4b and NS5 [2,3].

Previously, the potential for a viral outbreak was neglected, as it caused rare and mild infections in humans in Africa and Asia [4]. Later, outbreaks were identified elsewhere, such as Yap Island in Micronesia [5], French Polynesia in 2014 [6], Tahiti in 2013 [7], and New Caledonia in 2014 [8]. The main signs and symptoms known at the time included fever (37.8–39.5 °C), headaches, arthralgia of the hands and feet, conjunctivitis, and skin rash [5].

As of the first half of 2015, a generalized ZIKV epidemic occurred in South and Central America, with the northeast of Brazil being the most affected region. It is known that ZIKV causes Guillain-Barré Syndrome in adults [9] and congenital ZIKV syndrome (CZS) in fetuses infected during pregnancy, leading to severe neurological complications, including microcephaly, lissencephaly, ventriculomegaly, and cortical calcifications, associated or not with arthrogryposis, intrauterine growth restriction (IUGR), uveitis and retinal degeneration [10–12]. Unfortunately, most of these neurological modifications are irreversible and occurring in 6–12% of infected pregnant women [13,14]. Furthermore, neurological complications were also demonstrated in babies born without microcephaly [15–17].

Genetic differences, mainly related to antiviral immune response and neurodevelopment may directly influence susceptibility to infection [18,19]. Many of these genes

## ANEXO 4

Polonio et al. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*  
(2017) 23:41  
DOI 10.1186/s40409-017-0131-x

Journal of Venomous Animals and  
Toxins including Tropical Diseases

## REVIEW

## Open Access



# Zika virus congenital syndrome: experimental models and clinical aspects

Carolina Manganeli Polonio, Carla Longo de Freitas, Nagela Ghabdan Zanluqui and Jean Pierre Schatzmann Peron\*

## Abstract

Viral infections have long been the cause of severe diseases to humans, increasing morbidity and mortality rates worldwide, either in rich or poor countries. Yellow fever virus, H1N1 virus, HIV, dengue virus, hepatitis B and C are well known threats to human health, being responsible for many million deaths annually, associated to a huge economic and social cost. In this context, a recently introduced flavivirus in South America, called Zika virus (ZIKV), led the WHO to declare in February 1st 2016 a warning on Public Health Emergency of International Concern (PHEIC). ZIKV is an arbovirus of the *Flaviviridae* family firstly isolated from sentinels *Rhesus* sp. monkeys at the Ziika forest in Uganda, Africa, in 1947. Lately, the virus has well adapted to the worldwide spread *Aedes aegypti* mosquito, the vector for DENV, CHIKV, YFV and many others. At first, it was not considered a threat to human health, but everything changed when a skyrocketing number of babies born with microcephaly and adults with Guillain-Barré syndrome were reported, mainly in northeastern Brazil. It is now well established that the virus is responsible for the so called congenital Zika syndrome (CZS), whose most dramatic features are microcephaly, arthrogryposis and ocular damage. Thus, in this review, we provide a brief discussion of these main clinical aspects of the CZS, correlating them with the experimental animal models described so far.

**Keywords:** Zika virus, Congenital infection, Arthrogryposis, Ocular abnormality, Experimental models

## Background

Since the first semester of 2015, Brazil has experienced some unprecedented epidemics of babies born with microcephaly as well as of adults with peripheral flaccid paralysis, suggestive of Guillain-Barré syndrome (GBS). The first cases were detected in the states of Bahia, Pernambuco and Paraíba, which are still now the epicenter of the crisis. Although many possibilities were considered, it is now well established that both are caused by a recently introduced virus named Zika virus (ZIKV) [1–4].

The ZIKV is an arbovirus that belongs to the *Flaviviridae* family. It was first isolated from sentinels *Rhesus* sp. monkeys from the Ziika forest in Uganda, Africa, in 1947 [5]. Further, the virus was also isolated from the sylvatic vector, a mosquito of *Aedes africanus* species. Interestingly, the virus has well adapted to other species of mosquitoes, but most importantly to *Aedes aegypti* [6], widely spread through the globe, and a well-known vector for

many other viruses, including dengue (DENV), West Nile (WNV), yellow fever (YFV), chikungunya (CHV), Japanese encephalitis (JEV) and many others [7, 8].

ZIKV genome is composed of a positive single-stranded RNA that codifies three structural proteins, capsid (C), pre-membrane (Pr-M) and envelope (Env), and seven non-structural proteins, NS1, NS2a-2b, NS3, NS4a-4b and NS5 [9]. The biological function of these proteins, either in the invertebrate or in vertebrate hosts have just started to be elucidated. Whereas structural proteins are important molecules for cell invasion [10–12], and to induce the immune response, non-structural proteins are important for viral replication and immune response evasion [13, 14]. Recently, it was shown that ZIKV infectivity of *Aedes aegypti* depends on NS1 antigenemia. Interestingly, the Asian strain is much more infectious to mosquitoes than the African strain, mainly due to an alanine-to-valine amino acid substitution at the residue 188 of the NS1 [15].

Although ZIKV is considered an emerging infectious disease, it has been neglected for many years since human infection was early reported in Africa and Asia

\* Correspondence: jeanpierre@usp.br

Neuroimmune Interactions Laboratory, Immunology Department – ICB IV, University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 1730, Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-900, Brazil



© The Author(s). 2017 **Open Access** This article is distributed under the terms of the Creative Commons Attribution 4.0 International License (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons license, and indicate if changes were made. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated.





# AHR is a Zika virus host factor and a candidate target for antiviral therapy

Federico Giovannoni<sup>1,2</sup>, Irene Bosch<sup>3,4</sup>, Carolina Manganeli Polonio<sup>5,6</sup>, María F. Torti<sup>2</sup>, Michael A. Wheeler<sup>1</sup>, Zhaorong Li<sup>1</sup>, Leonardo Romorini<sup>7</sup>, María S. Rodriguez Varela<sup>7</sup>, Veit Rothhammer<sup>1</sup>, Andreia Barroso<sup>1</sup>, Emily C. Tjon<sup>1</sup>, Liliana M. Sanmarco<sup>1</sup>, Maisa C. Takenaka<sup>1</sup>, Seyed Mohamad Sadegh Modaresi<sup>1</sup>, Cristina Gutiérrez-Vázquez<sup>1</sup>, Nágela Ghabdan Zanluqui<sup>6,8</sup>, Nilton Barreto dos Santos<sup>9</sup>, Carolina Demarchi Munhoz<sup>10</sup>, Zhongyan Wang<sup>10</sup>, Elsa B. Damonte<sup>2</sup>, David Sherr<sup>10</sup>, Lee Gehrke<sup>3,11</sup>, Jean Pierre Schatzmann Peron<sup>12,13</sup>, Cybele C. Garcia<sup>12,13</sup> and Francisco J. Quintana<sup>1,12,13</sup>

**Zika virus (ZIKV) is a flavivirus linked to multiple birth defects including microcephaly, known as congenital ZIKV syndrome. The identification of host factors involved in ZIKV replication may guide efficacious therapeutic interventions. In genome-wide transcriptional studies, we found that ZIKV infection triggers aryl hydrocarbon receptor (AHR) activation. Specifically, ZIKV infection induces kynurenine (Kyn) production, which activates AHR, limiting the production of type I interferons (IFN-I) involved in antiviral immunity. Moreover, ZIKV-triggered AHR activation suppresses intrinsic immunity driven by the promyelocytic leukemia (PML) protein, which limits ZIKV replication. AHR inhibition suppressed the replication of multiple ZIKV strains in vitro and also suppressed replication of the related flavivirus dengue. Finally, AHR inhibition with a nanoparticle-delivered AHR antagonist or an inhibitor developed for human use limited ZIKV replication and ameliorated newborn microcephaly in a murine model. In summary, we identified AHR as a host factor for ZIKV replication and PML protein as a driver of anti-ZIKV intrinsic immunity.**

ZIKV is an enveloped, positive-sense, single-stranded RNA virus in the *Flavivirus* genus of the *Flaviviridae* family; this genus includes other viruses of public health concern such as dengue (DENV), yellow fever and Japanese encephalitis<sup>1</sup>. Human ZIKV infection was first reported in the 1950s in Africa, but fewer than 20 cases had been reported up to 2007 when the first ZIKV outbreak in Yap, Gabon and the South Pacific occurred<sup>2</sup>. In 2014 the virus spread to the Americas and, since then, 87 countries have reported the emergence of ZIKV<sup>3</sup>. The symptoms of ZIKV infection are generally mild and most ZIKV-infected individuals do not develop disease. However, following its re-emergence in 2013, ZIKV has been linked to a congenital Zika syndrome characterized by fetal brain abnormalities<sup>4</sup>, and also to Guillain-Barré syndrome<sup>5</sup>. Despite its association with these severe outcomes, no therapy is currently approved for the treatment of ZIKV or other flavivirus infection<sup>6</sup>, highlighting the unmet clinical need for approaches to manage emerging flavivirus outbreaks.

The development of effective therapies against ZIKV requires a better understanding of virus–host interactions and anti-

ral immunity. In addition to innate and adaptive immunity, cell intrinsic defense mechanisms, collectively known as intrinsic immunity, participate in the control of viral infections<sup>7</sup>. Intrinsic immunity is mediated by proteins that display antiviral activity and block viral replication at multiple levels, such as the products of 2′–5′-oligoadenylate synthetase 1b (*OAS1B*)<sup>8</sup>, interferon-stimulated exonuclease gene 20 (*ISG20*) and *PML* genes<sup>9</sup>. Little is known, however, about restriction factors that limit ZIKV replication.

In the present study, we report that ZIKV infection induces the production of kynurenine (Kyn), which activates AHR, leading to the suppression of IFN-I production, nuclear factor κ-light-chain-enhancer of activated B cells (NF-κB) signaling and intrinsic immunity mechanisms that suppress viral replication. Conversely, in vivo treatment with AHR antagonists suppresses viral replication in mouse fetal tissues, reducing overall fetal malformations linked to congenital Zika syndrome. Collectively, these studies define AHR as a host-enabling factor for ZIKV replication and PML protein as a driver of anti-ZIKV intrinsic immunity, and identify AHR antagonists as candidate therapeutics for the management of ZIKV infection.

<sup>1</sup>Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>2</sup>Laboratorio de Estrategias Antivirales, Departamento de Química Biológica, Facultad de Ciencias Exactas y Naturales, Universidad de Buenos Aires. CONICET—Instituto de Química Biológica, Buenos Aires, Argentina. <sup>3</sup>Institute for Medical Engineering and Science, Massachusetts Institute of Technology, Cambridge, MA, USA. <sup>4</sup>Department of Medicine, Mount Sinai School of Medicine, New York, NY, USA. <sup>5</sup>Neuroimmune Interactions Laboratory, Immunology Department—ICB IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>6</sup>Scientific Platform Pasteur—USP, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>7</sup>Laboratorio de Investigación aplicada a Neurociencias, Fundación para la Lucha contra las Enfermedades Neurológicas de la Infancia, Buenos Aires, Argentina. <sup>8</sup>Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>9</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Science, University of São Paulo, São Paulo, Brazil. <sup>10</sup>Dept. of Environmental Health, Boston University School of Public Health, Boston, MA, USA. <sup>11</sup>Program in Virology, Division of Medical Sciences, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>12</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA. <sup>13</sup>These authors contributed equally: Jean Pierre Schatzmann Peron, Cybele C. Garcia, Francisco J. Quintana. ✉e-mail: [jeanpierre@usp.br](mailto:jeanpierre@usp.br); [cygarcia@qb.fcen.uba.ar](mailto:cygarcia@qb.fcen.uba.ar); [fquintana@rics.bwh.harvard.edu](mailto:fquintana@rics.bwh.harvard.edu)

## ANEXO 6

## Article

# Identification of environmental factors that promote intestinal inflammation

<https://doi.org/10.1038/s41586-022-05308-6>

Received: 31 May 2021

Accepted: 1 September 2022

Published online: 20 October 2022

 Check for updates

Liliana M. Sanmarco<sup>1,2</sup>, Chun-Cheih Chao<sup>1,2</sup>, Yu-Chao Wang<sup>2,12</sup>, Jessica E. Kenison<sup>1,12</sup>, Zhaorong Li<sup>1</sup>, Joseph M. Rone<sup>1</sup>, Claudia M. Rejano-Gordillo<sup>1</sup>, Carolina M. Polonio<sup>1</sup>, Cristina Gutierrez-Vazquez<sup>1</sup>, Gavin Piester<sup>1,3</sup>, Agustin Plasencia<sup>1</sup>, Lucinda Li<sup>1</sup>, Federico Giovannoni<sup>1</sup>, Hong-Gyun Lee<sup>1</sup>, Camilo Faust Akt<sup>1</sup>, Michael A. Wheeler<sup>1,4</sup>, Ivan Mascanfroni<sup>1</sup>, Merja Jaronen<sup>1</sup>, Moneera Alsuwailm<sup>1</sup>, Patrick Hewson<sup>1</sup>, Ada Yeste<sup>1</sup>, Brian M. Andersen<sup>1,5</sup>, Diana G. Franks<sup>6</sup>, Chien-Jung Huang<sup>2</sup>, Millicent Ekwudo<sup>1</sup>, Emily C. Tjon<sup>1</sup>, Veit Rothhammer<sup>1</sup>, Maisa Takenaka<sup>1</sup>, Kalil Alves de Lima<sup>1</sup>, Mathias Linnerbauer<sup>1</sup>, Lydia Guo<sup>1</sup>, Ruxandra Covacu<sup>1</sup>, Hugo Queva<sup>1</sup>, Pedro Henrique Fonseca-Castro<sup>1</sup>, Maha Al Bladi<sup>1</sup>, Laura M. Cox<sup>1</sup>, Kevin J. Hodgetts<sup>1</sup>, Mark E. Hahn<sup>6</sup>, Alexander Mildner<sup>7</sup>, Joshua Korzenik<sup>8</sup>, Russ Hauser<sup>9</sup>, Scott B. Snapper<sup>10,11</sup> & Francisco J. Quintana<sup>1,4,12</sup>

Genome-wide association studies have identified risk loci linked to inflammatory bowel disease (IBD)—a complex chronic inflammatory disorder of the gastrointestinal tract. The increasing prevalence of IBD in industrialized countries and the augmented disease risk observed in migrants who move into areas of higher disease prevalence suggest that environmental factors are also important determinants of IBD susceptibility and severity<sup>2</sup>. However, the identification of environmental factors relevant to IBD and the mechanisms by which they influence disease has been hampered by the lack of platforms for their systematic investigation. Here we describe an integrated systems approach, combining publicly available databases, zebrafish chemical screens, machine learning and mouse preclinical models to identify environmental factors that control intestinal inflammation. This approach established that the herbicide propyzamide increases inflammation in the small and large intestine. Moreover, we show that an AHR–NF-κB–C/EBPβ signalling axis operates in T cells and dendritic cells to promote intestinal inflammation, and is targeted by propyzamide. In conclusion, we developed a pipeline for the identification of environmental factors and mechanisms of pathogenesis in IBD and, potentially, other inflammatory diseases.

Zebrafish offer multiple advantages for immune-related small-molecule screens because they reproduce in high numbers, are transparent during early developmental stages and have an immune system that shares important features with its human counterpart<sup>3–6</sup>. 2,4,6-trinitrobenzenesulfonic acid (TNBS) induces experimental T cell-driven colitis in mice<sup>7</sup>, and is also reported to induce intestinal inflammation in zebrafish<sup>8</sup>. Indeed, treatment of zebrafish larvae at 7 days post-fertilization (d.p.f.) with 25 μg ml<sup>-1</sup> TNBS resulted in the loss of crypt and villi morphology, expansion of the gut lumen and decreased gut peristaltic movement (Fig. 1a and Extended Data Fig. 1a,b), concomitant with increased expression of the pro-inflammatory genes *il17a/f*, *tnfa*, *ifng*, *il1b* and *nos2a* (Fig. 1b). Pharmacological inhibition of nitric oxide synthase (NOS) or activation of the aryl hydrocarbon receptor (AHR) with 6-formylindolo[3,2-b]carbazole (FICZ) ameliorated

intestinal inflammation in zebrafish (Fig. 1a–c and Extended Data Fig. 1c), recapitulating previous observations in mouse TNBS-induced colitis<sup>9</sup>. Moreover, treatment with lenalidomide, an inhibitor of T cell activation in zebrafish, mice and humans, or the use of lymphocyte-deficient *rag1*- or *rag2*-mutant zebrafish decreased TNBS-induced intestinal inflammation (Extended Data Fig. 1d–k), suggesting that T cells contribute to intestinal pathology induced by TNBS in 7 d.p.f. zebrafish.

To screen for environmental chemicals that modulate intestinal inflammation, we established a platform that integrates IBD genetics, high-throughput toxicology and small-molecule screens in the TNBS-induced colitis zebrafish model. In these studies, we used the EPA ToxCast database, which collects data on the activity of chemicals used in industry, agriculture and consumer products in high-throughput biochemical and cell-based assays<sup>10</sup>.

<sup>1</sup>Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>2</sup>Institute of Biomedical Informatics, National Yang Ming Chiao Tung University, Taipei, Taiwan. <sup>3</sup>Department of Pathology and Laboratory Medicine, University of Rochester Medical Center, Rochester, NY, USA. <sup>4</sup>The Broad Institute of Harvard and MIT, Cambridge, MA, USA. <sup>5</sup>Center for Neuro-Oncology, Dana-Farber Cancer Institute, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>6</sup>Biology Department, Woods Hole Oceanographic Institution, Woods Hole, MA, USA. <sup>7</sup>Max-Delbrück-Center for Molecular Medicine (MDC), Berlin, Germany. <sup>8</sup>Department of Gastroenterology, Hepatology and Endoscopy, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>9</sup>Harvard T. H. Chan School of Public Health, Boston, MA, USA. <sup>10</sup>Department of Pediatrics, Division of Gastroenterology, Hepatology and Nutrition, Boston Children's Hospital, Boston, MA, USA. <sup>11</sup>Department of Medicine, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>12</sup>These authors contributed equally: Liliana M. Sanmarco, Chun-Cheih Chao, Yu-Chao Wang, Jessica E. Kenison. ✉e-mail: fquintana@rics.bwh.harvard.edu

ANEXO 7

JIR-2021-0206-ver9-Borim\_1P.3d 02/08/22 1:48am Page 1

JIR-2021-0206-ver9-Borim\_1P  
Type: research-article

JOURNAL OF INTERFERON & CYTOKINE RESEARCH  
Volume 00, Number 00, 2022  
© Mary Ann Liebert, Inc.  
DOI: 10.1089/jir.2021.0206

RESEARCH MANUSCRIPT

Open camera or QR reader and scan code to access this article and other resources online.

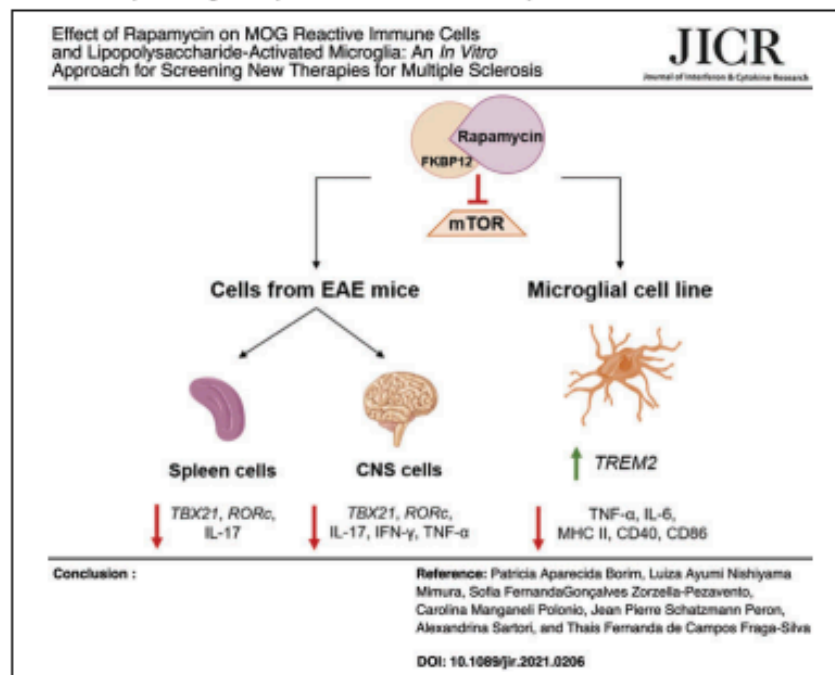


**AU1 ▶ Effect of Rapamycin on MOG Reactive Immune Cells and Lipopolysaccharide-Activated Microglia: An *In Vitro* Approach for Screening New Therapies for Multiple Sclerosis**

**AU2 ▶** Patricia Aparecida Borim,<sup>1</sup> Luiza Ayumi Nishiyama Mimura,<sup>2</sup> Sofia Fernanda Gonçalves Zorzella-Pezavento,<sup>2</sup> Carolina Manganelli Polonio,<sup>3</sup> Jean Pierre Schatzmann Peron,<sup>3</sup> Alexandrina Sartori,<sup>1,2</sup> and Thais Fernanda de Campos Fraga-Silva<sup>1</sup>

Rapamycin is an immunomodulatory drug that has been evaluated in preclinical and clinical trials as a disease-modifying therapy for multiple sclerosis (MS). In this study, we evaluated the *in vitro* effect of rapamycin on immune cells pivotally involved in the pathogenesis of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), which is an animal model to study MS. Splenocytes and central nervous system (CNS)-mononuclear cells obtained from

**AU3 ▶**



**AU4 ▶**

<sup>1</sup>Graduate Program in Tropical Diseases, Botucatu Medical School, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.  
<sup>2</sup>Institute of Biosciences, São Paulo State University (UNESP), Botucatu, Brazil.  
<sup>3</sup>Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (ICB IV/USP), São Paulo, Brazil.

## ANEXO 8

Received: 20 December 2021 | Revised: 10 July 2022 | Accepted: 12 July 2022

DOI: 10.1111/jnc.15679



## ORIGINAL ARTICLE

## SARS-CoV-2 infection impacts carbon metabolism and depends on glutamine for replication in Syrian hamster astrocytes

Lilian Gomes de Oliveira<sup>1,2</sup> | Yan de Souza Angelo<sup>1,2</sup> | Pedro Yamamoto<sup>1,2</sup> | Victor Corasolla Carregari<sup>3</sup> | Fernanda Crunfli<sup>3</sup> | Guilherme Reis-de-Oliveira<sup>3</sup> | Lícia Costa<sup>3</sup> | Pedro Henrique Vendramini<sup>3</sup> | Érica Almeida Duque<sup>4</sup> | Nilton Barreto dos Santos<sup>4,†</sup> | Egidi Mayara Firmino<sup>5</sup> | Isadora Marques Paiva<sup>5</sup> | Gláucia Maria Almeida<sup>6</sup> | Adriano Sebollela<sup>6</sup> | Carolina Manganeli Polonio<sup>1,2</sup> | Nagela Ghabdan Zanluqui<sup>1,2</sup> | Marília Garcia de Oliveira<sup>1</sup> | Patrick da Silva<sup>1,2</sup> | Gustavo Gastão Davanzo<sup>7</sup> | Marina Caçador Ayupe<sup>8</sup> | Caio Loureiro Salgado<sup>8</sup> | Antônio Francisco de Souza Filho<sup>9</sup> | Marcelo Valdemir de Araújo<sup>9</sup> | Taiana Tainá Silva-Pereira<sup>9</sup> | Angélica Cristine de Almeida Campos<sup>10</sup> | Luiz Gustavo Bentim Góes<sup>10</sup> | Marielton dos Passos Cunha<sup>10</sup> | Elia Garcia Caldini<sup>11</sup> | Maria Regina D'Império Lima<sup>12</sup> | Denise Moraes Fonseca<sup>8</sup> | Ana Márcia de Sá Guimarães<sup>9</sup> | Paola Camargo Minoprio<sup>10</sup> | Carolina Demarchi Munhoz<sup>4</sup> | Cláudia Madalena Cabrera Mori<sup>13</sup> | Pedro Manoel Moraes-Vieira<sup>7</sup> | Thiago Mattar Cunha<sup>5</sup> | Daniel Martins-de-Souza<sup>3,14,15,16</sup> | Jean Pierre Schatzmann Peron<sup>1,2,17</sup>

<sup>1</sup>Neuroimmune Interactions Laboratory, Institute of Biomedical Sciences, Department of Immunology, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>2</sup>Neuroimmunology of Arboviruses Laboratory, Scientific Platform Pasteur-USP, University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil

<sup>3</sup>Laboratory of Neuroproteomics, Department of Biochemistry and Tissue Biology, Institute of Biology, University of Campinas (UNICAMP), Campinas, SP, Brazil

<sup>4</sup>Department of Pharmacology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup>Center for Research in Inflammatory Diseases (CRID), Department of Pharmacology—Ribeirão Preto Medical School—University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>6</sup>Department of Biochemistry and Immunology, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>7</sup>Laboratory of Immunometabolism, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

**Abbreviations:** 2-DG, 2-deoxy-D-glucose-6-phosphate; ACE-2, angiotensin-converting enzyme; ACN, acetonitrile; ALS, amyotrophic lateral sclerosis; CAN, acetonitrile; cDNA, complementary deoxy-ribonucleic acid; CMV, cytomegalovirus; COVID-19, coronavirus disease 2019; CPT-1a, carnitine palmitoyltransferase 1a; Ct, cycle threshold; DAPI, 4',6'-diamidino-2-phenylindole; DEP, differentially expressed protein; DIA, data-independent acquisition; DLPFC, dorso-lateral prefrontal cortex; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DNA, deoxy-ribonucleic acid; DON, 6-diazo-5-oxo-L-nor-Leucine; dpi, days post infection; dpp, days postpartum; E, envelope; EDTA, 2,2',2''-(Ethane-1,2-diyldinitrilo) tetraacetic acid; EMRT, exact mass retention time; ETO, etomoxir; FASP, fast adaptative and secure; FBS, fetal bovine serum; FDR, false discovery rate; GABA, 4-aminobutanoic acid; GLS, mitochondrial glutaminase; H<sub>2</sub>O, water; HCCl, chloroform; HD, huntington disease; HILIC, hydrophobic interaction liquid chromatography; HIV, human immunodeficiency virus; hpi, hours post infection; HSV, herpes simplex virus; ICB, institute of biomedical sciences; IFN, Interferon; IL, Interleukin; ISG, interferon-stimulated gene; KEGG, kyoto encyclopedia of genes and genomes; LC, liquid chromatography; M, mass; M, membrane; MDA-5, melanoma differentiation-associated protein 5; MeOH, Methanol; MOI, multiplicity of infection; MRI, magnetic resonance imaging; MS, mass spectrometry; N, nucleocapsid; NEAA, non-essential amino acids; NH<sub>4</sub>CHOO, ammonium acetate; NH<sub>4</sub>OH, ammonium hydroxide; ORF, open reading frame; OSN, olfactory sensory neurons; PASC, post-acute sequelae of COVID-19; PBS, phosphate-buffered saline; PCA, principal component analysis; PD-1, programmed cell death protein 1; PFA, paraformaldehyde; PFU, plaque-forming units; RIG-I, retinoic acid-inducible gene I; RNA, ribonucleic acid; RT-qPCR, quantitative real-time polymerase chain reaction; S, spike; SARS, severe acute respiratory syndrome; sgRNA, subgenomic RNA; snRNA-seq, single nuclei RNA sequencing; SPPU, Scientific Platform Pasteur-USP; TCA, tricarboxylic acid cycle; TCID<sub>50</sub>, median tissue culture infectious dose; TEM, transmission electron microscopy; TIM-3, T-cell immunoglobulin and mucin-domain containing-3; TMPSR2, transmembrane protease serine 2; TNF- $\alpha$ , tumor necrosis factor-alpha; TRIS, 2-amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol; UMAP, uniform manifold approximation and projection; UPLC, ultra-performance liquid chromatography; USP, University of São Paulo; vGLUT, vesicular glutamate transporters; WHO, World Health Organization; Z, charge.

Lilian Gomes de Oliveira and Yan de Souza Angelo contributed equally to this work.

†In memoriam of a great scientist and human being that lost the battle against COVID-19.

## ANEXO 9

Clinical Science (2021) 135 1065–1082  
<https://doi.org/10.1042/CS20201544>



## Research Article

# Murine endometrial-derived mesenchymal stem cells suppress experimental autoimmune encephalomyelitis depending on indoleamine-2,3-dioxygenase expression

Carolina Manganeli Polonio<sup>1</sup>, Carla Longo de Freitas<sup>1</sup>, Marília Garcia de Oliveira<sup>1</sup>, Cristiano Rossato<sup>1</sup>, Wesley Nogueira Brandão<sup>1</sup>, Nágela Ghabdan Zanluqui<sup>1,2</sup>, Lilian Gomes de Oliveira<sup>1</sup>, Luiza Ayumi Nishiyama Mimura<sup>3</sup>, Maysa Braga Barros Silva<sup>4</sup>, Vera Lúcia Garcia Calich<sup>5</sup>, Marcelo Gil Nisenbaum<sup>6</sup>, Silvio Halpern<sup>7</sup>, Lucila Evangelista<sup>6</sup>, Mariangela Maluf<sup>8</sup>, Paulo Perin<sup>8</sup>, Carlos Eduardo Czeresnia<sup>6</sup> and Jean Pierre Schatzmann Peron<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; <sup>2</sup>Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; <sup>3</sup>Institute of Biosciences, UNESP, Botucatu, SP, Brazil; <sup>4</sup>Clinical Biochemistry Laboratory, Clinical Analysis Department, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; <sup>5</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil; <sup>6</sup>Division of Reproductive Medicine, Célula Mater, São Paulo, SP, Brazil; <sup>7</sup>Division of Reproductive Medicine, Halpern Clinic, São Paulo, SP, Brazil; <sup>8</sup>Division of Reproductive Medicine, CEERH, São Paulo, SP, Brazil

Correspondence: Jean Pierre Schatzmann Peron ([jeanpierre@usp.br](mailto:jeanpierre@usp.br))

Cellular therapy with mesenchymal stem cells (MSCs) is a huge challenge for scientists, as little translational relevance has been achieved. However, many studies using MSCs have proved their suppressive and regenerative capacity. Thus, there is still a need for a better understanding of MSCs biology and the establishment of newer protocols, or to test unexplored tissue sources. Here, we demonstrate that murine endometrial-derived MSCs (meMSCs) suppress Experimental Autoimmune Encephalomyelitis (EAE). MSC-treated animals had milder disease, with a significant reduction in Th1 and Th17 lymphocytes in the lymph nodes and in the central nervous system (CNS). This was associated with increased *Ii27* and *Cyp1a1* expression, and presence of IL-10-secreting T CD4<sup>+</sup> cells. At EAE peak, animals had reduced CNS infiltrating cells, histopathology and demyelination. qPCR analysis evidenced the down-regulation of several pro-inflammatory genes and up-regulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO). Consistently, co-culturing of WT and IDO<sup>-/-</sup> meMSCs with T CD4<sup>+</sup> cells evidenced the necessity of IDO on the suppression of encephalitogenic lymphocytes, and IDO<sup>-/-</sup> meMSCs were not able to suppress EAE. In addition, WT meMSCs stimulated with IL-17A and IFN- $\gamma$  increased IDO expression and secretion of kynurenines *in vitro*, indicating a negative feedback loop. Pathogenic cytokines were increased when CD4<sup>+</sup> T cells from AhR<sup>-/-</sup> mice were co-cultured with WT meMSC. In summary, our research evidences the suppressive activity of the unexplored meMSCs population, and shows the mechanism depends on IDO-kynurenines-Aryl hydrocarbon receptor (AhR) axis. To our knowledge this is the first report evidencing that the therapeutic potential of meMSCs relying on IDO expression.

Received: 23 December 2020  
 Revised: 19 April 2021  
 Accepted: 26 April 2021

Version of Record published:  
 07 May 2021

## REVIEW

Neuro-Immune Interactions Focus

# Functional immune cell–astrocyte interactions

Liliana M. Sanmarco<sup>1\*</sup>, Carolina M. Polonio<sup>1,2\*</sup>, Michael A. Wheeler<sup>1,3\*</sup>, and Francisco J. Quintana<sup>1,3</sup>

**Astrocytes are abundant glial cells in the central nervous system (CNS) that control multiple aspects of health and disease. Through their interactions with components of the blood–brain barrier (BBB), astrocytes not only regulate BBB function, they also sense molecules produced by peripheral immune cells, including cytokines. Here, we review the interactions between immune cells and astrocytes and their roles in health and neurological diseases, with a special focus on multiple sclerosis (MS). We highlight known pathways that participate in astrocyte crosstalk with microglia, NK cells, T cells, and other cell types; their contribution to the pathogenesis of neurological diseases; and their potential value as therapeutic targets.**

## Introduction

Complex biological responses involving the coordinated activities of multiple cell types in the central nervous system (CNS) control neurological function and dysfunction. A growing body of evidence points to the importance for CNS physiology of the reciprocal communication between CNS-resident cells and the immune system. Indeed, one area of particular interest is the role of neuroimmune interactions between astrocytes and immune cells in health and disease.

Astrocytes are abundant CNS glial cells that participate in diverse processes ranging from synaptogenesis to neuron metabolic support, the regulation of blood–brain barrier (BBB) function, and behavior (Allen and Lyons, 2018; Ben Haim and Rowitch, 2017; Khakh and Deneen, 2019; Linnerbauer et al., 2020). In addition to the control of these and other functions in the healthy CNS, diverse astrocyte subsets play key roles in multiple neurological diseases, including multiple sclerosis (MS; Kim et al., 2014; Mayo et al., 2014; Rothhammer et al., 2016, 2018; Itoh et al., 2018; Wheeler et al., 2019, 2020; Linnerbauer et al., 2020; Sanmarco et al., 2021), Alzheimer's disease (AD; Habib et al., 2020; Mathys et al., 2019; Zhou et al., 2020), Huntington's disease (Diaz-Castro et al., 2019; Jiang et al., 2016; Khakh et al., 2017; Tong et al., 2014; Yu et al., 2018), and acute CNS injury (Anderson et al., 2016; Anderson et al., 2018). Although reactive astrocytes were originally identified over 100 yr ago (Andriezen, 1893), the advent of new technologies to dissect astrocyte molecular and phenotypic heterogeneity in depth has led to a rapid growth in our understanding of astrocyte heterogeneity and its regulation. Consequently, the diverse functions

of astrocytes in health and disease are now appreciated to encompass a continuum of cellular states with the potential for plasticity and reprogramming (Anderson et al., 2014; Ben Haim and Rowitch, 2017; Escartin et al., 2021; Khakh and Deneen, 2019; Linnerbauer et al., 2020).

## Astrocyte heterogeneity in health and disease

The heterogeneity of astrocytes is best exemplified by their complex morphology. Astrocytes exhibit highly ramified processes; each astrocyte contacts ~100,000 synapses in mice (Houades et al., 2008) and up to 2,000,000 in humans (Oberheim et al., 2009). Indeed, astrocytes are key components of the tripartite synapse, which encompasses pre- and postsynaptic neuron membranes and surrounding astrocytes (Allen and Eroglu, 2017), buffering neurotransmitter release, controlling neuronal excitability, and modulating synaptic plasticity. Recent reports have linked astrocyte electrical activity via Ca<sup>2+</sup> waves to multiple behaviors, including memory, repetitive behavior, and fear (Adamsky et al., 2018; Boisvert et al., 2018; Martin-Fernandez et al., 2017; Nagai et al., 2019; Nagai et al., 2021; Yu et al., 2018), highlighting the physiological roles of these astrocyte–neuron interactions.

Astrocytes are in close contact with the CNS blood supply. Through direct interactions with components of the BBB, including endothelial cells and pericytes, astrocytes not only regulate BBB function but also sense molecules produced by circulating peripheral cells, including cytokines (Sanmarco et al., 2021; Sofroniew, 2015). In fact, roughly 97% of astrocytes are estimated to contact blood vessels (Foo et al., 2011), suggesting

<sup>1</sup>Ann Romney Center for Neurological Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA; <sup>2</sup>Neuroimmune Interactions Laboratory, Immunology Department, Instituto de Ciências Biomédicas IV, University of São Paulo, São Paulo, Brazil; <sup>3</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA.

\*L.M. Sanmarco, C.M. Polonio, and M.A. Wheeler contributed equally to this paper; Correspondence to Francisco J. Quintana: [fquintana@bwh.harvard.edu](mailto:fquintana@bwh.harvard.edu).

© 2021 Sanmarco et al. This article is distributed under the terms of an Attribution–Noncommercial–Share Alike–No Mirror Sites license for the first six months after the publication date (see <http://www.rupress.org/terms/>). After six months it is available under a Creative Commons License (Attribution–Noncommercial–Share Alike 4.0 International license, as described at <https://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/4.0/>).

## ANEXO 11

Stem Cell Reviews and Reports (2022) 18:609–625  
<https://doi.org/10.1007/s12015-021-10226-7>



## Human Fallopian Tube – Derived Mesenchymal Stem Cells Inhibit Experimental Autoimmune Encephalomyelitis by Suppressing Th1/Th17 Activation and Migration to Central Nervous System

Carla Longo de Freitas<sup>1,7</sup> · Carolina Manganeli Polonio<sup>1,7</sup> · Wesley Nogueira Brandão<sup>1,7</sup> · Cristiano Rossato<sup>1,7</sup> · Nágela Ghabdan Zanluqui<sup>1,2,7</sup> · Lilian Gomes de Oliveira<sup>1,7</sup> · Marília Garcia de Oliveira<sup>1,7</sup> · Lucila Pires Evangelista<sup>3,7</sup> · Silvio Halpern<sup>4,7</sup> · Mariangela Maluf<sup>5,7</sup> · Carlos Eduardo Czresnia<sup>3,7</sup> · Paulo Perin<sup>5,7</sup> · Danilo Candido de Almeida<sup>6,7</sup> · Jean Pierre Schatzman Peron<sup>1,2,7</sup>

Accepted: 24 July 2021 / Published online: 28 August 2021

© The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

Mesenchymal stem cells comprise a natural reservoir of undifferentiated cells within adult tissues. Given their self-renewal, multipotency, regenerative potential and immunomodulatory properties, MSCs have been reported as a promising cell therapy for the treatment of different diseases, including neurodegenerative and autoimmune diseases. In this study, we investigated the immunomodulatory properties of human tubal mesenchymal stem cells (htMSCs) using the EAE model. htMSCs were able to suppress dendritic cells activation downregulating antigen presentation-related molecules, such as MHCII, CD80 and CD86, while impairing IFN- $\gamma$  and IL-17 and increasing IL-10 and IL-4 secretion. It further correlated with milder disease scores when compared to the control group due to fewer leukocytes infiltrating the CNS, specially Th1 and Th17 lymphocytes, associated with increased IL-10 secreting Tr1 cells. Conversely, microglia were less activated and infiltrating mononuclear cells secreted higher levels of IL-4 and IL-10 and expressed reduced chemokine receptors as CCR4, CCR6 and CCR8. qPCR of the spinal cords revealed upregulation of indoleamine-2,3-dioxygenase (IDO) and brain derived neurotrophic factor (BDNF). Taken together, here evidenced the potential of htMSCs as an alternative for the treatment of inflammatory, autoimmune or neurodegenerative diseases.

**Keywords** Mesenchymal stem cell · Immunomodulation · EAE · Dendritic cells · Lymphocytes

✉ Jean Pierre Schatzman Peron  
 jeanpierre@usp.br

<sup>1</sup> Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, University of São Paulo (USP), Av. Prof. Lineu Prestes, 1730 Lab 232. Cidade Universitária, São Paulo, SP CEP 05508-000, Brazil

<sup>2</sup> Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo (USP), São Paulo, Brazil

<sup>3</sup> Reproductive Medicine Division, Célula Mater Clinic, São Paulo, Brazil

<sup>4</sup> Reproductive Medicine Division, Halpern Clinic, São Paulo, Brazil

<sup>5</sup> Reproductive Medicine Division, CEERH Clinic, São Paulo, Brazil

<sup>6</sup> Nephrology Division, Federal University of São Paulo (UNIFESP), São Paulo, Brazil

<sup>7</sup> Scientific Platform Pasteur-USP, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

### Introduction

Mesenchymal stem/stromal cells (MSCs) are typically defined as undifferentiated multipotent adult cells that possess capacity of self-renewal and differentiation into distinct mesoderm-derived lineages [1]. These progenitor cells are present in adult organisms where they constitute a reservoir found within the connective tissue of most organs, and are involved in the maintenance, repair and immunologic properties of tissues throughout the postnatal life of an individual [2].

Looking beyond their potential in tissue repair and regeneration, MSCs are a promising tool for overcoming autoimmunity, mainly due to their immunosuppressive capacities [3]. These activities are not constitutive, but may be induced by an inflammatory environment to which MSCs are exposed, such as soluble factors or by physical contact with inflammatory cells. The former, includes proinflammatory

## ANEXO 12



Contents lists available at ScienceDirect

## Brain Behavior and Immunity

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/ybrbi](http://www.elsevier.com/locate/ybrbi)

## Gas6 drives Zika virus-induced neurological complications in humans and congenital syndrome in immunocompetent mice

Joao Luiz Silva-Filho<sup>a,1</sup>, Lilian G. de Oliveira<sup>b,1</sup>, Leticia Monteiro<sup>a</sup>, Pierina L. Parise<sup>c</sup>, Nagela G. Zanluqui<sup>b</sup>, Carolina M. Polonio<sup>b</sup>, Carla L. de Freitas<sup>b</sup>, Daniel A. Toledo-Teixeira<sup>c</sup>, William M. de Souza<sup>d,e</sup>, Najara Bittencourt<sup>a</sup>, Mariene R. Amorim<sup>c</sup>, Julia Forato<sup>c</sup>, Stéfanie P. Muraro<sup>c</sup>, Gabriela F. de Souza<sup>c</sup>, Matheus C. Martini<sup>c</sup>, Karina Bispo-dos-Santos<sup>c</sup>, Aline Vieira<sup>c</sup>, Carla C. Judice<sup>a</sup>, Glaucia M. Pastore<sup>f</sup>, Eliana Amaral<sup>g</sup>, Renato Passini Junior<sup>g</sup>, Helaine M.B.P. Mayer-Milanez<sup>g</sup>, Carolina C. Ribeiro-do-Valle<sup>g</sup>, Roseli Calil<sup>g</sup>, João Renato Bennini Junior<sup>g</sup>, Giuliane J. Lajos<sup>g</sup>, Albina Altemani<sup>h</sup>, Marcos T. Nolasco da Silva<sup>i</sup>, Ana Carolina Coan<sup>j</sup>, Maria Francisca Colella-Santos<sup>k</sup>, Andrea P.B. von Zuben<sup>l</sup>, Marco Aurélio R. Vinolo<sup>m</sup>, Clarice Weis Arns<sup>m</sup>, Rodrigo Ramos Catharino<sup>n</sup>, Maria Laura Costa<sup>g</sup>, Rodrigo N. Angerami<sup>l,o</sup>, André R.R. Freitas<sup>l</sup>, Mariangela R. Resende<sup>o</sup>, Márcia T. Garcia<sup>o</sup>, Maria Luiza Moretti<sup>o</sup>, Laurent Renia<sup>p,q</sup>, Lisa F.P. Ng<sup>p,q</sup>, Carla V. Rothlin<sup>r</sup>, Fabio T.M. Costa<sup>a,\*</sup>, Jean Pierre Schatzmann Peron<sup>b,s,t,\*</sup>, José Luiz Proença-Modena<sup>c,u,\*</sup>

<sup>a</sup> Laboratory of Tropical Diseases Prof. Luiz Jacintho Silva, Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>b</sup> Neuroimmune Interactions Laboratory, Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>c</sup> Laboratory of Emerging Viruses (LEVE), Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>d</sup> Virology Research Center, Ribeirão Preto Medical School, University of São Paulo, Ribeirão Preto, Brazil

<sup>e</sup> Department of Microbiology and Immunology, University of Texas Medical Branch, Galveston, TX, USA

<sup>f</sup> Faculty of Food Engineering, UNICAMP, Brazil

<sup>g</sup> Department of Obstetrics and Gynecology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>h</sup> Department of Clinical Pathology, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, Brazil

<sup>i</sup> Pediatric Immunology, Center for Investigation in Pediatrics, Faculty of Medical Sciences, UNICAMP, Brazil

<sup>j</sup> Department of Neurology, School of Medical Sciences, UNICAMP, Brazil

<sup>k</sup> Department of Human Development and Rehabilitation, School of Medical Sciences, UNICAMP, Brazil

<sup>l</sup> Campinas Department of Public Health Surveillance, Campinas, Brazil

<sup>m</sup> Department of Genetics, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, UNICAMP, Brazil

<sup>n</sup> School of Pharmaceutical Sciences, UNICAMP, Campinas, Brazil

<sup>o</sup> Department of Internal Medicine, School of Medical Sciences, University of Campinas, Campinas, SP, Brazil

<sup>p</sup> A\*STAR Infectious Diseases Labs (A\* ID Labs), Agency for Science, Technology and Research, Biopolis, Singapore

<sup>q</sup> Singapore Immunology Network, Agency for Science, Technology and Research, Biopolis, Singapore

<sup>r</sup> Department of Immunobiology, Yale University, School of Medicine, New Haven, CT, United States

<sup>s</sup> Immunopathology and Allergy Post Graduate Program, School of Medicine, University of São Paulo, São Paulo, Brazil

<sup>t</sup> Scientific Platform Pasteur-USP, University of São Paulo (USP), São Paulo, SP, Brazil

<sup>u</sup> Experimental Medicine Research Cluster (EMRC), University of Campinas, Campinas, SP 13083-862, Brazil

## ARTICLE INFO

Keywords:  
Zika virus

## ABSTRACT

Zika virus (ZIKV) has the ability to cross placental and brain barriers, causing congenital malformations in neonates and neurological disorders in adults. However, the pathogenic mechanisms of ZIKV-induced neurological

\* Corresponding authors at: Department of Genetics, Evolution, Microbiology and Immunology, Institute of Biology, University of Campinas, Brazil (F.T.M. Costa, J.L. Proença-Modena), Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, University of Sao Paulo, Brazil (J.P. Schatzmann Peron).

E-mail addresses: [costaftm@unicamp.br](mailto:costaftm@unicamp.br) (F.T.M. Costa), [jeanpierre@usp.br](mailto:jeanpierre@usp.br) (J.P.S. Peron), [jlmodena@unicamp.br](mailto:jlmodena@unicamp.br) (J.L. Proença-Modena).

<sup>1</sup> These authors equally contributed to this work.

<https://doi.org/10.1016/j.bbi.2021.08.008>

Received 17 June 2021; Received in revised form 2 August 2021; Accepted 5 August 2021

Available online 11 August 2021

0889-1591/© 2021 Elsevier Inc. All rights reserved.



## Article


# Gut-licensed IFN $\gamma$ <sup>+</sup> NK cells drive LAMP1<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup> anti-inflammatory astrocytes

<https://doi.org/10.1038/s41586-020-03116-4>

Received: 27 March 2020

Accepted: 24 November 2020

Published online: 06 January 2021

 Check for updates

Liliana M. Sanmarco<sup>1,9</sup>, Michael A. Wheeler<sup>1,2,9</sup>, Cristina Gutlérrez-Vázquez<sup>1</sup>, Carolina Manganeli Polonio<sup>1</sup>, Mathias Linnerbauer<sup>1</sup>, Felipe A. Pinho-Ribeiro<sup>3</sup>, Zhaorong Li<sup>1,2</sup>, Federico Giovannoni<sup>1</sup>, Katelyn V. Batterman<sup>4</sup>, Giulia Scalis<sup>1</sup>, Stephanie E. J. Zandee<sup>5,6</sup>, Evelyn S. Heck<sup>1</sup>, Moneera Alsuwailm<sup>1,7</sup>, Douglas L. Rosene<sup>4</sup>, Burkhard Becher<sup>8</sup>, Isaac M. Chiu<sup>3</sup>, Alexandre Prat<sup>5,6</sup> & Francisco J. Quintana<sup>1,2,9</sup>

Astrocytes are glial cells that are abundant in the central nervous system (CNS) and that have important homeostatic and disease-promoting functions<sup>1</sup>. However, little is known about the homeostatic anti-inflammatory activities of astrocytes and their regulation. Here, using high-throughput flow cytometry screening, single-cell RNA sequencing and CRISPR–Cas9-based cell-specific *in vivo* genetic perturbations in mice, we identify a subset of astrocytes that expresses the lysosomal protein LAMP1<sup>2</sup> and the death receptor ligand TRAIL<sup>3</sup>. LAMP1<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup> astrocytes limit inflammation in the CNS by inducing T cell apoptosis through TRAIL–DR5 signalling. In homeostatic conditions, the expression of TRAIL in astrocytes is driven by Interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) produced by meningeal natural killer (NK) cells, in which IFN $\gamma$  expression is modulated by the gut microbiome. TRAIL expression in astrocytes is repressed by molecules produced by T cells and microglia in the context of inflammation. Altogether, we show that LAMP1<sup>+</sup>TRAIL<sup>+</sup> astrocytes limit CNS inflammation by inducing T cell apoptosis, and that this astrocyte subset is maintained by meningeal IFN $\gamma$ <sup>+</sup> NK cells that are licensed by the microbiome.

Astrocytes are abundant cells in the CNS that perform important functions in development and homeostasis associated with neuron metabolism<sup>4,5</sup>, regulation of neural activity<sup>6</sup>, production of synaptogenic factors<sup>7</sup>, and control of the glia limitans<sup>8</sup> and the blood–brain barrier<sup>9</sup>. These homeostatic mechanisms are central to CNS physiology, and their dysregulation contributes to the pathogenesis of neurological diseases<sup>8</sup>. In addition, in the context of neurological disorders, astrocytes acquire functions that promote and amplify CNS pathology, such as neurotoxic activity, and the ability to activate microglia and recruit peripheral pro-inflammatory cells<sup>10–13</sup>. This breadth of astrocyte functions reflects the existence of diverse—and potentially plastic—astrocyte subsets or activation states that are associated with homeostatic and pathogenic activities<sup>14–16</sup>. Although multiple pathogenic functions have been defined for astrocytes in the context of CNS inflammation<sup>1</sup>, less is known about the homeostatic anti-inflammatory activities of astrocytes and their regulation.

T cells recruited to the inflamed CNS can modulate astrocyte responses<sup>16–18</sup>, but astrocytes can potentially respond to molecules produced by other peripheral immune cells in the meninges during homeostasis<sup>19</sup>. In addition, some microbial metabolites have been shown to reach the CNS and act directly on astrocytes<sup>20</sup> and microglia<sup>21–24</sup> to modulate their phenotype and function. Here we describe a subset of astrocytes that is driven by IFN $\gamma$  produced by meningeal

NK cells, and show that IFN $\gamma$  expression in these NK cells is modulated by the commensal flora. This subpopulation of astrocytes limits inflammation in the CNS by inducing TRAIL-dependent apoptosis in pro-inflammatory T cells.

## Identification of LAMP1<sup>+</sup> astrocytes

To identify novel subsets of astrocytes, we used flow cytometry to assess the binding of 266 antibodies to mouse astrocytes expressing enhanced green fluorescent protein (EGFP) under the control of the *Aldh1l1* promoter (*Aldh1l1*<sup>EGFP</sup> mice) (Fig. 1a–c, Extended Data Fig. 1, Supplementary Table 1). Approximately 60 antibodies showed higher reactivity with *Aldh1l1*<sup>EGFP</sup> astrocytes than with *Aldh1l1*<sup>−</sup> cells (Fig. 1b, c, Extended Data Fig. 1, Supplementary Table 1). We then analysed the expression of the top 15 surface markers in *Aldh1l1*<sup>creERT2tdTomato</sup> spinal cord astrocytes isolated from naive mice or from mice 16 and 27 days (peak and recovery, respectively) after the induction of experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) by immunization with MOG<sub>35–55</sub> peptide. The most abundant marker expressed by spinal cord astrocytes was lysosomal-associated membrane protein 1 (LAMP1; also known as CD107a)<sup>2</sup>, which was upregulated during EAE in spinal cord astrocytes, but not in cerebellar, cortical or parenchymal (subcortical) astrocytes (Fig. 1d–g, Extended Data Fig. 2a–c).

<sup>1</sup>Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>2</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA, USA.

<sup>3</sup>Department of Immunology, Harvard Medical School, Boston, MA, USA. <sup>4</sup>Department of Anatomy and Neurobiology, Boston University School of Medicine, Boston, MA, USA.

<sup>5</sup>Neuroimmunology Unit, Centre de Recherche du CHUM, Montréal, Québec, Canada. <sup>6</sup>Department of Neuroscience, Faculty of Medicine, Université de Montréal, Montréal, Québec, Canada.

<sup>7</sup>Center of Excellence for Biomedicine, Joint Centers of Excellence Program, King Abdulaziz City for Science and Technology (KACST), Riyadh, Saudi Arabia. <sup>8</sup>Institute of Experimental Immunology, University of Zurich, Zurich, Switzerland. <sup>9</sup>These authors contributed equally: Liliana M. Sanmarco, Michael A. Wheeler. <sup>✉</sup>e-mail: fquintana@rics.bwh.harvard.edu

## RESEARCH

## RESEARCH ARTICLE

## NEUROSCIENCE

## Barcoded viral tracing of single-cell interactions in central nervous system inflammation

Iain C. Clark<sup>1,2,†</sup>, Cristina Gutiérrez-Vázquez<sup>1,†</sup>, Michael A. Wheeler<sup>1,3,†</sup>, Zhaorong Li<sup>1,3</sup>, Veit Rothhammer<sup>1,4</sup>, Mathias Linnerbauer<sup>1,4</sup>, Liliana M. Sanmarco<sup>1</sup>, Lydia Guo<sup>5</sup>, Manon Blain<sup>5</sup>, Stephanie E. J. Zandee<sup>6</sup>, Chun-Cheih Chao<sup>4</sup>, Katelyn V. Batterman<sup>7</sup>, Marius Schwabenland<sup>8</sup>, Peter Lotfy<sup>1,3</sup>, Amalia Tejada-Velarde<sup>1,†</sup>, Patrick Hewson<sup>1</sup>, Carolina Manganeli Polonio<sup>1</sup>, Michael W. Shults<sup>5</sup>, Yasmin Salem<sup>1</sup>, Emily C. Tjon<sup>1</sup>, Pedro H. Fonseca-Castro<sup>1</sup>, Davis M. Borucki<sup>1</sup>, Kalil Alves de Lima<sup>1</sup>, Agustín Plasencia<sup>1</sup>, Adam R. Abate<sup>9,10</sup>, Douglas L. Rosene<sup>7</sup>, Kevin J. Hodgetts<sup>1</sup>, Marco Prinz<sup>8,11,12</sup>, Jack P. Antel<sup>6</sup>, Alexandre Prat<sup>6</sup>, Francisco J. Quintana<sup>1,3,\*</sup>

Cell-cell interactions control the physiology and pathology of the central nervous system (CNS). To study astrocyte cell interactions in vivo, we developed rabies barcode interaction detection followed by sequencing (RABID-seq), which combines barcoded viral tracing and single-cell RNA sequencing (scRNA-seq). Using RABID-seq, we identified axon guidance molecules as candidate mediators of microglia-astrocyte interactions that promote CNS pathology in experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE) and, potentially, multiple sclerosis (MS). In vivo cell-specific genetic perturbation EAE studies, in vitro systems, and the analysis of MS scRNA-seq datasets and CNS tissue established that Sema4D and Ephrin-B3 expressed in microglia control astrocyte responses via PlexinB2 and EphB3, respectively. Furthermore, a CNS-penetrant EphB3 inhibitor suppressed astrocyte and microglia proinflammatory responses and ameliorated EAE. In summary, RABID-seq identified microglia-astrocyte interactions and candidate therapeutic targets.

**A**strocytes are central nervous system (CNS)-resident glial cells with important roles in health and disease. Astrocyte functions in development, homeostasis, and disease are controlled by cell interactions (1–10). For example, astrocyte interactions with microglia regulate synaptic pruning (11), neurodegeneration (2), and CNS inflammation (12).

In the context of autoimmune CNS disorders such as multiple sclerosis (MS) and its pre-clinical model, experimental autoimmune encephalomyelitis (EAE), astrocyte activation is modulated by T cells and other peripheral immune cells recruited to the inflamed CNS (3, 6, 10, 12–16). However, the full extent of cell interactions that control astrocyte responses and the molecular mechanisms involved are poorly understood. The investigation of those interactions is further complicated by the heterogeneity of astrocytes and other cell types, as well as the need to define the specific cell subsets participating in interactions of interest.

High-throughput genomic approaches such as single-cell RNA sequencing (scRNA-seq) and spatial transcriptomics can profile thousands of individual cells, but challenges remain in applying these approaches to study cell interactions. Moreover, although some techniques can profile immune cell interactions (17, 18) and cell networks based on the sequencing of microdissected units (19) or the use of photoactivatable markers (20), these approaches cannot easily profile cell interactions in the CNS and may fail to detect interactions involving only a small subset of cells.

We developed rabies barcode interaction detection followed by sequencing (RABID-seq) to identify astrocyte cell interactions and the molecular phenotypes of interacting cells in vivo. RABID-seq uses glycoprotein G-deficient pseudorabies virus (RabAG) engineered to express a fluorescent mRNA-encoded barcode

as it spreads between interacting cells, allowing the reconstruction of cellular cross-talk in vivo via scRNA-seq. By encoding spatial relationships directly into the transcriptome, RABID-seq detects cell interactions that otherwise would not be detected by single-cell profiling alone. Using RABID-seq, we identified the axon guidance molecules Sema4D-PlexinB2 and Ephrin-B3-EphB3 as mediators of microglia-astrocyte interactions that promoted CNS pathology in EAE. Moreover, we identified a CNS-penetrant small-molecule inhibitor of EphB3 signaling that ameliorates acute and chronic progressive EAE. In summary, RABID-seq provides an approach for the comprehensive investigation of cell interactions in the CNS with single-cell resolution, identifying microglia-astrocyte interactions and candidate targets for therapeutic intervention in neurologic disorders.

## RABID-seq overview

RabAG is a powerful tool for studying cell interactions because it can be targeted to specific cell types, including astrocytes and other glia (21–25) (Fig. 1A). To study astrocyte cell interactions, we engineered the RabAG virus to express barcoded mCherry (RabAG-mCherry-BC). Because barcode sequences are inserted before the transcriptional stop of the polyadenylated mCherry transcript, the transcribed mRNA barcode can be analyzed by scRNA-seq (Fig. 1B). In addition, mCherry allows the isolation by flow cytometry of fluorescently labeled barcoded cells in a RabAG-transduced cell network (Fig. 1C), enabling the simultaneous analysis of cell transcriptomes and RabAG barcodes by high-throughput droplet-based scRNA-seq (Fig. 1D).

After amplification and sequencing, we detected ~1.5 million unique sequences in the barcoded RabAG-mCherry-BC plasmid library (fig. S1, A to C). We pseudotyped the rabies virus from the barcoded RabAG-mCherry-BC plasmid library using envelope protein of subgroup A (EnvA) packaging, which only infects cells expressing the EnvA receptor TVA and thereby allows the genetic targeting of cells of interest in vivo (21, 25, 26). Because the resulting pseudotyped rabies virus library was estimated to contain 10<sup>4</sup> to 10<sup>5</sup> unique barcodes (fig. S1D), we predicted that 91 to 99% of infected cells will be uniquely barcoded if 1000 cells were initially infected with the pseudotyped RabAG-mCherry-BC virus library (Fig. 1, E and F).

We used an in vitro system to confirm that infection with pseudotyped RabAG-mCherry-BC virus is restricted to TVA-expressing cells (Fig. 1, G to I) and developed a polymerase chain reaction (PCR)-based strategy for amplifying rabies connection barcodes from cDNA generated by the inDrop workflow (Fig. 1J and fig. S1, E and F). Notably, RabAG-mCherry-BC sequencing libraries retain three crucial pieces

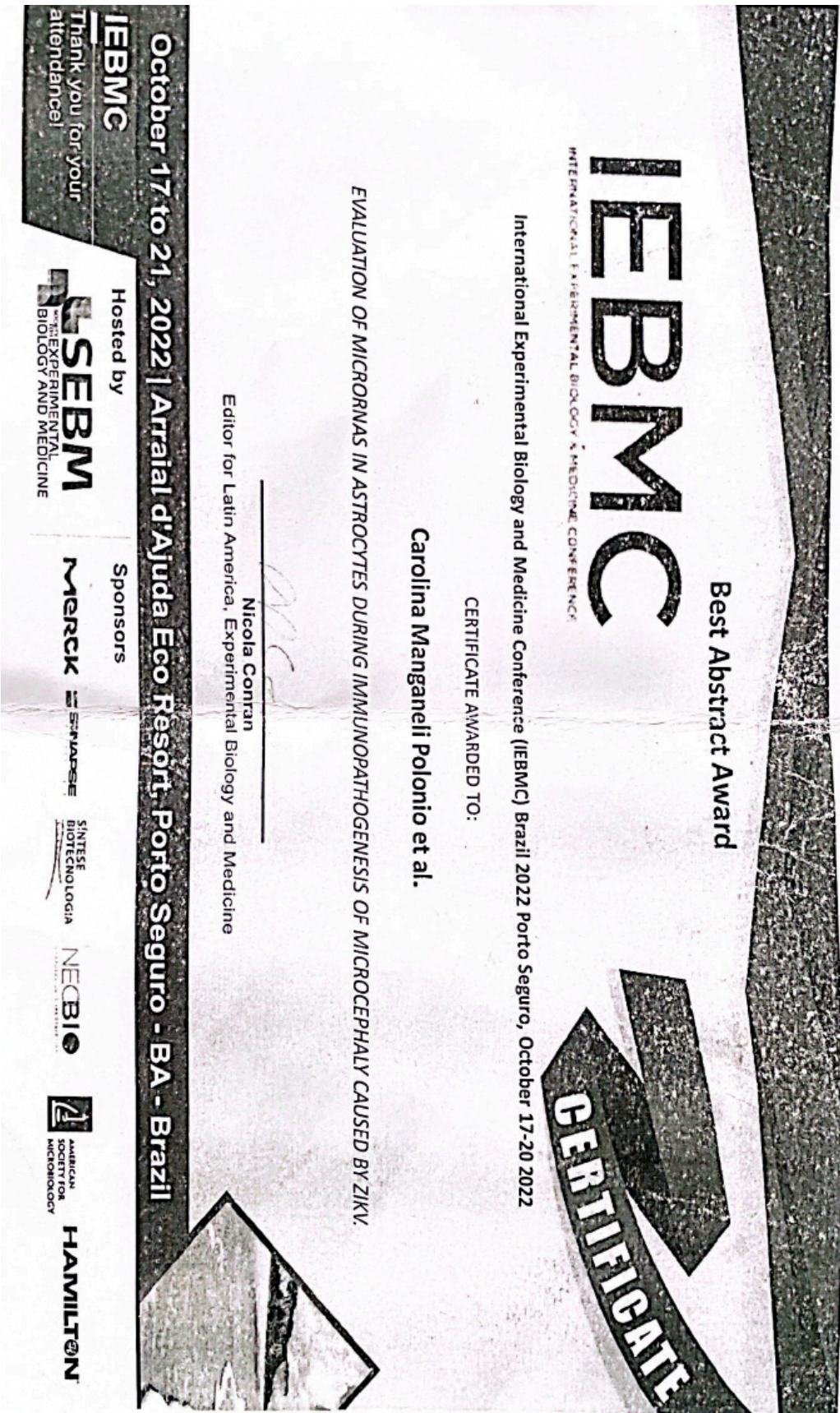
<sup>1</sup>Ann Romney Center for Neurologic Diseases, Brigham and Women's Hospital, Harvard Medical School, Boston, MA 02115, USA. <sup>2</sup>Department of Bioengineering, University of California, Berkeley, California Institute for Quantitative Biosciences, Berkeley, CA 94720, USA. <sup>3</sup>Broad Institute of MIT and Harvard, Cambridge, MA 02142, USA. <sup>4</sup>Department of Neurology, University Hospital Erlangen, Friedrich-Alexander University Erlangen-Nürnberg, 91054 Erlangen, Germany. <sup>5</sup>Neuroimmunology Unit, Montreal Neurological Institute, Department of Neurology and Neurosurgery, McGill University, Montreal, QC H3A 2B4, Canada. <sup>6</sup>Neuroimmunology Research Laboratory, Centre de Recherche du Centre Hospitalier de l'Université de Montréal (CRCHUM), Montreal, QC H2X 0A9, Canada. <sup>7</sup>Department of Anatomy and Neurobiology, Boston University School of Medicine, Boston, MA 02118, USA. <sup>8</sup>Institute of Neuropathology, University of Freiburg, D-79106 Freiburg, Germany. <sup>9</sup>Department of Bioengineering and Therapeutic Sciences, University of California, San Francisco, California Institute for Quantitative Biosciences, San Francisco, CA 94158, USA. <sup>10</sup>Chan Zuckerberg Biohub, San Francisco, CA, USA. <sup>11</sup>Signaling Research Centres BIOSSE and CIBSS, University of Freiburg, D-79106 Freiburg, Germany. <sup>12</sup>Center for Basics in NeuroModulation (NeuroModBasics), Faculty of Medicine, University of Freiburg, D-79106 Freiburg, Germany.

\*Corresponding author. Email: fquintana@bwh.harvard.edu

†These authors contributed equally to this work.

‡Present address: Immunology Department, Hospital Universitario Ramón y Cajal, Madrid, Spain. Instituto Ramón y Cajal de Investigación Sanitaria (IRYCIS), Madrid, Spain.

ANEXO 15



ANEXO 16



**Sociedade Brasileira de Bioquímica e  
Biologia Molecular — SBBq**

Member of The Pan-American Association for Biochemistry and Molecular Biology and  
The International Union of Biochemistry and Molecular Biology

**RECIBO**

Recebi da Sociedade Brasileira de Bioquímica e Biologia Molecular, o valor líquido de R\$ **8.261,70** (oito mil, duzentos e sessenta e um reais e setenta centavos), equivalentes ao valor de R\$ **10.196,33** (dez mil, cento e noventa e seis reais e trinta e três centavos) com o desconto do IRRF de R\$ **1.934,63** (um mil, novecentos e trinta e quatro reais e sessenta e três centavos), que será pago pela SBBq. Valor líquido equivalente a US\$ 1.500,00 (um mil e quinhentos dólares americanos), convertido em reais com a taxa do dólar do dia 08/10/2021 do Banco Central do Brasil, referente a premiação em primeiro lugar no 24º Prêmio Jovem Talento em Ciências da Vida, patrocinado pela Cytiva, realizado durante a 20<sup>th</sup> IUPAB Congress, 45<sup>th</sup> Annual SBBf Meeting, e 50<sup>th</sup> Annual SBBq Meeting, no formato virtual, no período de 4 a 8 de outubro de 2021.

São Paulo, 08 de outubro de 2021.

**Carolina Manganeli Polonio**  
RG 37.233.706-5  
CPF 424.150.668-26

ANEXO 17



© SOTS 2018

UTHO IN USA

ANEXO 18

