

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
HOSPITAL DE REABILITAÇÃO DE ANOMALIAS CRANIOFACIAIS

KAIQUE CESAR DE PAULA SILVA

**Investigação de flavivírus como possível etiologia de fator
ambiental em fissuras orofaciais não sindrômicas – um estudo *in
silico***

BAURU
2021

KAIQUE CESAR DE PAULA SILVA

Investigação de flavivírus como possível etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais não sindrômicas – um estudo *in silico*

Tese constituída por artigo apresentada ao Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências da Reabilitação, na área de concentração Fissuras Orofaciais e Anomalias Relacionadas.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Soares
Co-orientadora: Profa. Dra. Virgínia Bodelão Richini Pereira

BAURU
2021

Silva, Kaique Cesar de Paula

Investigação de flavivirus como possível etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais não sindrômicas / Kaique Cesar de Paula Silva. -- Bauru, 2021.

103 p. : il. ; 31 cm.

Tese (doutorado) -- Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais, Universidade de São Paulo, 2021.

Orientadora: Profa. Dra. Simone Soares

Autorizo exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta tese, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data

ERRATA

FOLHA DE APROVAÇÃO

DEDICATÓRIA

Dedico:

Primeiramente esta etapa a Deus, por ser meu mestre, orientador, pai, amigo e por renovar a cada momento minhas forças e disposição para chegar até aqui.

A minha família e aos meus poucos amigos, por acreditarem em minha missão, perguntarem e se importarem, mesmo não entendendo muito da área.

A todos os profissionais que lutam a cada dia em benefício das pessoas com fissuras orofaciais e anomalias relacionadas.

A todos os pacientes que um dia passaram pelo nosso querido “Centrinho”.

E também em memória dos meus queridos avós, que sempre relataram seu orgulho e apoiaram-me a seguir este caminho, como Doutor Biomédico e Professor.

E para encerrar esta dedicatória eu digo que concordo plenamente com a frase de August Pullman do livro extraordinário do qual ele diz que: “Todo mundo deveria ser aplaudido de pé pelo menos uma vez na vida, porque todos nós vencemos o mundo”. E por vencermos, todos aos que agradei e a todos os vencedores, eu dedico este trabalho.

AGRADECIMENTOS

Meus agradecimentos se iniciam dizendo que é uma honra estar aqui no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo desde a minha Iniciação científica em 2013, é um enorme prazer fazer parte da história deste centro de estudos que é referência no Brasil e no mundo. Agradeço aos meus mentores nesta jornada: professor, amigo e orientador desde o início de minha jornada Dr. Narciso Almeida Vieira, a minha orientadora de mestrado Dra. Gisele da Silva Dalben e a minha atual orientadora desta etapa de doutorado Dra. Simone Soares que com empatia, paciência e sempre muita dedicação me ajudou a pôr em prática um ideal de trabalho que a muitos causaria espanto, agradeço imensamente a confiança e a oportunidade.

Agradeço a cada funcionário, professor e representante da pós-graduação que com paciência me ajudou por esta jornada ao longo destes anos. Em especial, agradeço aos funcionários da secretaria e do comitê de ética em pesquisa, que a cada passo do percurso me auxiliaram quando eu ficava perdido, posso dizer que estes que estão nos bastidores deste longo caminho fizeram toda a diferença.

Agradeço as parcerias firmadas e em especial ao Instituto Adolfo Lutz e a Dra. Virginia Bodelão Richini Pereira por todo auxílio nesse percurso.

Agradeço a CAPES (Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior) pelo apoio financeiro recebido, qual foi pontual para realização desta jornada.

Agradeço ao meu companheiro de pesquisa e área, Thiago Silva Messias, que me ajudou a ingressar e quebrar a cabeça na virologia, sempre pronto a ajudar em análises e interpretações.

Por último, e não menos importante, agradeço a minha família que apoiou em diversos momentos, aos meus amigos e em especial ao Thiago Carvalho da Silva que sempre trouxe uma palavra de auxílio em momentos de crise. E enfim sem fazer menção a cada um que passou pelo meu caminho ao longo dos anos e que contribuiu para esta realização.

A todos estes, dedico um singular: **“MUITO OBRIGADO, VOCÊ FEZ TODA A DIFERENÇA!”**.

“Entre o que as coisas aparentam ser e o que realmente são, há uma grande diferença”.

Lois Lowry - O doador de memórias

“Talvez seja este o aprendizado mais difícil: manter-se em movimento permanente, com sua mente em uma renovação constante, seguindo seu caminho e se adaptando às mudanças”.

Kaique Cesar de Paula Silva

Releitura de Maria Helena Kuhner

RESUMO

As fissuras orofaciais são malformações congênitas que comprometem a fisiologia, morfologia e afetam psicologicamente os pacientes, com etiologia complexa, podendo estar associada a genética e a fatores ambientais. Os vírus são um dos fatores ambientais mais bem relacionados às malformações congênitas, são parasitas intracelulares obrigatórios e os organismos mais abundantes do planeta que coevoluem com seus hospedeiros. O exemplo mais recente de vírus associado a malformação congênita é o *Zika virus*, membro do gênero *Flavivirus*, composto por diversos agentes etiológicos de arboviroses, de distribuição dinâmica e global, de grande importância a saúde pública como: *Dengue virus*, *Yellow fever virus* e *West Nile virus*. Como a investigação dos flavivírus como etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais é escassa ou até inexistente, o presente estudo objetivou investigar o potencial dos flavivírus de importância em saúde pública, como etiologia de fissuras orofaciais. Criamos para nossa análise um método de pontuação com sete tópicos baseado em literatura e experimentação *in silico* (doença, passagem transplacentária, tropismo, dano celular, caso relatado, análise de similaridade de genoma e transcriptoma entre vírus e hospedeiro), utilizando para obter os genomas virais o *NCBI virus* e para as análises de similaridade o *BLAST 2.12.0*, ajustado para buscar apenas sequências humanas relacionadas a fissuras orofaciais com o limiar estatístico definido para o *E-value* ≤ 1 . Os flavivírus de importância em saúde pública que apresentaram potencial alto de causar fissuras orofaciais foram os sorotipos 2, 3 e 4 da espécie *Dengue virus* e a linhagem 2 da espécie *West Nile virus*, enquanto o *Yellow fever virus*, *Japanese encephalitis virus*, *Tick-borne encephalitis virus* e *Saint Louis encephalitis virus* apresentaram potencial médio de causar fissuras orofaciais. Quanto aos flavivírus emergentes no Brasil, a cepa Iguape vírus (espécie *Aroa virus*) apresentou potencial alto, seguido pela espécie *Cacipacore virus* e a cepa Rocio vírus (espécie *Ilheus virus*) com potencial médio de causar fissuras orofaciais. Qualquer agente etiológico possui potencial de causar malformações congênitas se estiver “no momento e no lugar certo”, porém alguns possuem maior potencial. Assim, sugerimos que para as espécies *Dengue virus*, *West Nile virus* e *Aroa virus*, que apresentaram alto potencial para atuarem como agentes etiológicos de fator ambiental em fissuras orofaciais, medidas de controle e prevenção sejam implementadas, quanto aos vetores biológicos (mosquitos e carrapatos), principalmente para a gestante, e ressaltamos a necessidade de estudos *in vivo* e *in vitro*, para elucidação dessas possibilidades.

Palavras-chave: Fenda labial, Fissura palatina, Flavivirus, Etiologia, Fissuras Orofaciais.

ABSTRACT

Investigation of flaviviruses as a possible etiology of environmental factor in non-syndromic orofacial clefts

Orofacial clefts are congenital malformations that compromise the physiology, morphology and psychologically, with a complex etiology and may be associated with genetics and environmental factors. Viruses are one of the environmental factors best related to congenital malformations, they are obligate intracellular parasites and the most abundant organisms on the planet that co-evolve with their hosts. The most recent example of virus associated with congenital malformation is the *Zika virus*, a member of the *Flavivirus* genus, composed of several etiological agents of arboviruses, of dynamic and global distribution and great importance to public health, such as: *Dengue virus*, *Yellow fever virus* and *West Nile virus*. As the investigation of flaviviruses as an etiology of an environmental factor in orofacial clefts is scarce or even non-existent, the present study aimed to investigate the potential of flaviviruses of public health importance as an etiology of orofacial clefts. We created for our analysis a scoring method with seven topics based on literature and in silico experimentation (disease, transplacental passage, tropism, cell damage, case reported, genome and transcriptome similarity analysis between virus and host), using to obtain the genomes viral the NCBI virus and for the similarity analysis the BLAST 2.12.0, adjusted to search only human sequences related to orofacial clefts with the statistical threshold defined for the E-value ≤ 1 . The flaviviruses of public health importance that showed high potential to cause orofacial clefts were serotypes 2, 3 and 4 of the *Dengue virus* species and strain 2 of the *West Nile virus* species, while *Yellow fever virus*, *Japanese encephalitis virus*, *Tick-borne encephalitis virus* and *Saint Louis encephalitis virus* showed medium potential to cause orofacial clefts. As for flaviviruses emerging in Brazil, the *Iguape virus* strain (*Aroa virus* species) had high potential, followed by the *Cacipacore virus* species and the *Rocio virus* strain (*Ilheus virus* species) with medium potential to cause orofacial clefts. Any etiologic agent has the potential to cause congenital malformations if it is “at the right time and place”, but some have greater potential. Thus, we suggest that for the species *Dengue virus*, *West Nile virus* and *Aroa virus*, which have high potential to act as etiological agents of environmental factor in orofacial clefts, control and prevention measures need to be implemented regarding biological vectors (mosquitoes and ticks), especially for pregnant women and we emphasize the need for in vivo and in vitro studies to elucidate these possibilities.

Keywords: Cleft lip, Cleft palate, Flavivirus, Etiology, Orofacial cleft.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURAS

Figura 1 -	Representação da Maxila e do Forame Incisivo.....	30
Figura 2 -	Representação dos Grupos I, II e III de Spina e colaboradores (1972)...	31
Figura 3 -	Classificação de Baltimore.....	33
Figura 4 -	Mecanismos de Penetração Viral.....	34
Figura 5 -	Replicação de Vírus de Ácido Desoxirribonucleico (DNA).....	34
Figura 6 -	Replicação de Vírus de Ácido Ribonucleico (RNA).....	35
Figura 7 -	Brotamento Viral.....	36
Figura 8 -	Dinâmica de Interação Vírus-Células com o Exemplo de Papiloma Vírus.....	37
Figura 9 -	Representação do Vírion do Gênero <i>Flavivirus</i>	38
Figura 10 -	Representação da Tradução de Proteínas dos Flavivírus.....	39
Figura 11 -	Biossíntese dos Flavivírus.....	40
Figura 12 -	Simulação Computacional de Regiões da Proteína S do SARS-CoV-2 Potencialmente Susceptíveis a Antivirais.....	42

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Artigo 1- O potencial dos flavivírus de importância em saúde pública de causar fissuras orofaciais, 2021.....	48
Tabela 1. Artigo 2- O potencial dos flavivírus emergentes no Brasil de causar fissuras orofaciais, 2021.....	62

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

<i>A. aegypt</i>	<i>Aedes aegypt</i>
<i>A. africanus</i>	<i>Aedes africanus</i>
<i>A. albopictus</i>	<i>Aedes albopictus</i>
<i>A. bromeliae</i>	<i>Aedes bromeliae</i>
ABNT	Associação Brasileira de Normas Técnicas
ANKS6	<i>Ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6</i>
AG	Aparelho de Golgi
APOIV	<i>Apoi virus</i> (Vírus Apoi)
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
DENV	<i>Dengue virus</i> (Vírus da Dengue)
DENV-1	Dengue vírus sorotipo 1
DENV-2	Dengue vírus sorotipo 2
DENV-3	Dengue vírus sorotipo 3
DENV-4	Dengue vírus sorotipo 4
DNA	Ácido desoxirribonucleico
<i>dsDNA</i>	Ácido desoxirribonucleico de fita dupla
<i>dsRNA</i>	Ácido ribonucleico de fita dupla
C	Proteína estrutural Capsídeo
<i>C. tritaeniorbynchus</i>	<i>Culex tritaeniorbynchus</i>
E	Proteína estrutural Envelope
<i>ER</i>	Reticulo endoplasmático
<i>ESCRT</i>	Complexos de endossomos de transporte
EVEs	Elementos Virais Endógenos
FOs	Fissuras Orofaciais
FVTCs	Flavivírus transmitidos por carrapatos
FVTMs	Flavivírus transmitidos por mosquitos
FVTVDs	Flavivírus transmitidos por vetores desconhecidos
GeneCards®	The Human Gene Database
HHV-1	<i>Human alphaherpesvirus 1</i> (Vírus Herpes Simplex 1)
HRAC/USP	Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística

Inf.	Informação
<i>I. persulcatus</i>	<i>Ixodes persulcatus</i>
<i>I. ricinus</i>	<i>Ixodes ricinus</i>
LILACS	Literatura Latino-Americana e do Caribe em Ciências da Saúde
M	Proteína estrutural de membrana
MEDLINE	Medical Literature Analysis and Retrieval System Online
NCBI	National Center for Biotechnology Information
NLM	National Library of Medicine
NS1	Proteína não estrutural 1
NS2A	Proteína não estrutural 2A
NS2B	Proteína não estrutural 2B
NS3	Proteína não estrutural 3
NS4A	Proteína não estrutural 4A
NS4B	Proteína não estrutural 4B
NS5	Proteína não estrutural 5
OMIN®	Online Mendelian Inheritance in Man
pH	Potencial de hidrogênio
PNPLA1	<i>Patatin like phospholipase domain containing 1</i>
<i>poll II</i>	Polimerase II
prM	Proteína estrutural Pré-membrana
PRDM13	<i>PR/SET domain 13</i>
RBV	<i>Rubivirus rubellae</i> (Vírus da Rubéola)
RBD	Domínio de ligação do receptor
<i>RdRp</i>	RNA polimerase RNA dependente
RE	Reticulo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RNAfs+	Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade positiva
RNAm	Ácido ribonucleico mensageiro
<i>RTase</i>	Transcriptase reversa
<i>mRNA</i>	Ácido ribonucleico mensageiro
SARS-CoV-2	Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2
SciELO	Scientific Electronic Library Online
SGB	Síndrome de Guillain-Barré
SLEV	<i>Saint Louis encephalitis virus</i> (Vírus da Encefalite de Saint Louis)

spp	Espécies
<i>ssDNA</i>	Ácido desoxirribonucleico de fita simples
<i>+ssRNA</i>	Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade positiva
<i>-ssRNA</i>	Ácido ribonucleico de fita simples com polaridade negativa
<i>±ssRNA</i>	Ácido ribonucleico ambisenso
STORCH	Acrônimo: Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes
TBX18	<i>T-box transcription factor 18</i>
TBEV	<i>Tick-borne encephalitis virus</i> (Vírus da Encefalite do Carrapato)
UFP	Unidade formadora de plaque
WNV	<i>West Nile virus</i> (Vírus do Oeste do Nilo)
WNV-1	West Nile virus linhagem 1
WNV-2	West Nile virus linhagem 2
YFV	<i>Yellow fever virus</i> (Vírus da Febre Amarela)
ZIKV	<i>Zika virus</i> (Vírus Zika)
ZIKV-BR	Zika vírus cepa Belém
ZIKV-CE	Zika vírus cepa Ceará
ZIKV-PA	Zika vírus cepa Paraíba

LISTA DE SÍMBOLOS

%	Percentual
+	Sentido de leitura 5'-3'
-	Sentido de leitura 3'-5'
±	Sentido de leitura ambisenso
®	Registrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	18
2	OBJETIVOS	25
3	RELAÇÃO ENTRE OS ARTIGOS	29
4	ARTIGOS	43
4.1	ARTIGO 1	45
4.2	ARTIGO 2	61
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS	76
	REFERÊNCIAS	80
	ANEXO	94

1 *Introdução*

1 INTRODUÇÃO

As anomalias congênitas afetam aproximadamente 5% dos nascidos vivos, dentre as quais as alterações craniofaciais compõem um grupo de destaque. No Brasil mesmo com a infrequência e dispersão dos dados estima-se uma variação de 0,47 a 2% para cada 1.000 nascidos vivos (SOUZA, 1987; NAZER, 2001; MONLLÉO & LOPES, 2006). Essas anomalias resultam de alterações morfológicas durante o desenvolvimento embrionário humano, ocorridas no início da vida intrauterina. Possuem uma etiologia complexa e multifatorial com um grande destaque ao fator ambiental e podem ser caracterizadas em anomalias isoladas e múltiplas, de etiologia genética associada ou não às síndromes (MONLLÉO, 2006; TAN *et al.*, 2013).

Entre as malformações craniofaciais mais comuns estão as fissuras orofaciais (FOs) acometendo de 0,2 a 0,9% a cada 1000 nascidos vivos (OWENS, 1985; LOFFREDO, 2001). As FOs geram um grande impacto sobre a vida dos indivíduos por ela acometidos, afetando funções básicas como respiração, alimentação, fala e estética. Influenciando de forma perene a saúde do paciente (AMARAL, 1996), principalmente devido à estigmatização e exclusão social, que interferem no desenvolvimento das relações interpessoais, autoestima e integração (CHAN, 2006).

Em um estudo de caso controle pioneiro no Brasil em 1994, Loffredo e colaboradores investigaram no estado de São Paulo, um vasto perfil epidemiológico, incluindo a análise quantitativa de fatores ambientais relacionados a poluição, uso de drogas, doenças da mãe nos primeiros meses gestacionais, exposição a herbicidas e a pesticidas em lavouras, exposição à radiação e hereditariedade, colaborando de forma significativa com a investigação da etiologia multifatorial dessas anomalias demonstrando que a hereditariedade e poluição eram os principais fatores de risco da população estudada (LOFFREDO *et al.*, 1994). Demonstrando assim a necessidade de conhecimento dos fatores ambientais envolvidos nas FOs.

Um dos principais fatores ambientais, para a ocorrência de alterações embrionárias apresentados na literatura, são os vírus (WIGG *et al.*, 2013). Os vírus são organismos acelulares com comportamento parasitário a nível intracelular, possuindo RNA (Ácido ribonucleico) ou DNA (Ácido desoxirribonucleico). Estimativas apontam que os vírus são a entidade biológica mais abundante do planeta (BREITBART; ROHWER, 2005), existindo pelo menos um para cada organismo celular já estudado (KOONIN *et al.*, 2006). As viroses mais populares no Brasil estão relacionadas a artrópodes e humanos e são denominadas arboviroses “*arthropod borne viroses*”, consideradas como uma das principais classes de doenças infecciosas emergentes (GUBLER, 2001). Os vírus se multiplicam nos hospedeiros e nos artrópodes hematófagos e são

transmitidos para novos vertebrados susceptíveis, através da picada do vetor infectado, recomeçando assim o ciclo epidemiológico (WHO, 1967; MOORE *et al.*, 1993).

Devido à grande diversidade, os vírus são usualmente organizados em reino, domínio, filo, classe, ordem, família, gênero e espécie que possuem características morfológicas e filogenéticas semelhantes. No reino *Riboviria* (vírus de RNA), dentro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* estão localizados algumas das arboviroses de maior importância para saúde pública, como *Dengue virus* (Vírus da Dengue - DENV), *Yellow fever virus* (Vírus da Febre Amarela - YFV), *West Nile virus* (Vírus do Oeste do Nilo - WNV) e o *Zika virus* (Vírus Zika - ZIKV), que recentemente se tornou alvo de intensas pesquisas (WHO, 2016; ICTV, 2021).

Os membros do gênero *Flavivirus* são distribuídos por todo globo e são agentes etiológicos de diversas epidemias de difícil controle, devido suas características epidemiológicas dinâmicas (MACKENZIE, GUBLER, PETERSEN, 2004). Esses vírus são divididos em três grupos filogenéticos: FVTCs - flavivírus transmitidos por carrapatos, FVTMs – flavivírus transmitidos por mosquitos e os FVTVDs – flavivírus transmitidos por vetores desconhecidos (KITCHEN, SHACKELTON, HOLMES, 2011).

Em geral os FVTMs possuem características semiológicas similares. O indivíduo pode apresentar mialgia, dor articular, eritema maculopapular de forma variada e estado febril, tais sintomas acometem de 20 a 40% dos infectados (MUSSO *et al.*, 2014). O doente também pode apresentar vertigem e disfunções digestivas. Isto pode ser explicado pelas características de replicação viral que majoritariamente ocorrem no fígado. A transmissão é realizada principalmente pela picada de um inseto, sendo até o momento os mosquitos (*Aedes spp*, *Albopictus spp*), os vetores mais comuns relacionados ao contágio (PETERSEN *et al.*, 2016).

Outras formas de transmissão também foram evidenciadas em algumas viroses causadas pelo ZIKV e DENV: pela via sexual (FOY, *et al.*, 2011; LOPES *et al.*, 2014; MUSSO *et al.*, 2015; HILLS *et al.*, 2016; WHO, 2016) e por transfusão sanguínea (MUSSO *et al.*, 2014; VASQUEZ *et al.*, 2016). Além disso estudos apontam a detecção de partículas virais na urina e saliva dos indivíduos infectados (MUSSO *et al.*, 2014; RATHER *et al.*, 2017).

Na Polinésia Francesa, foram relatados dois casos de transmissão perinatal do ZIKV durante o surto em 2013 e 2014. O RNA viral estava presente nas mães e nas crianças e também no leite materno. A possível via de transmissão seria a transplacentária, a qual já tinha sido confirmada para outras arboviroses como o DENV, WNV e YFV (BESNARD *et al.*, 2014).

A infecção pelo ZIKV foi associada atualmente com alterações no período embrionário, no caso da microcefalia. Além disso o ZIKV e DENV estão sendo relacionados a transtornos imunológicos como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB). O que aumentou a atenção da

comunidade médica e científica sobre o que pode ser a causa agravante durante a infecção de agentes pertencentes ao gênero *Flavivirus* (MUSSO, 2015; CAO-LORMEAU *et al.*, 2016; RASMUSSEN *et al.*, 2016).

Em 2016 foi relatado três casos de FOs possivelmente ligadas a infecção pelo ZIKV (GUIMARÃES *et al.*, 2016), o que proporcionou uma visão expansiva para a etiologia das fissuras. Em outros dois trabalhos foram evidenciados a presença de FOs e outras malformações em neonatos expostos ao ZIKV (FONTELES, 2018; RODRIGUEZ-MORALES, 2018).

Um dos FVTCs mais conhecidos é o *Tick-borne encephalitis virus* (Vírus da Encefalite do Carrapato - TBEV) presente na Ásia e Europa. Os sintomas relacionados ao TBEV variam de síndromes febris a meningoencefalites com aproximadamente 30% de mortalidade (KAISER, 2008; MANSFIELD *et al.*, 2009; PIERSON, DIAMOND, 2013). Milhares de casos são registrados a cada ano (CDC, 2018) e o ciclo da doença é mantido pelo carrapato *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*) que se alimenta de animais vertebrados (KAISER, 2008). Também ocorre no hospedeiro a replicação viral em tecido dérmico permitindo a transmissão pelo leite materno (LABUDA *et al.*, 1996). Já os FVTVDs não são associados a doenças humanas conhecidas, porém casos de viroses por *Apoi virus* (Vírus Apoi - APOIV) com sintomas clássicos como febre, artralgia e mialgia foram identificados em acidentes laboratoriais (BLITVICH; FIRTH, 2017).

Diferente do padrão *in vivo* e *in vitro*, o presente trabalho utilizou de metodologia *in silico* (por meio de dados públicos do NCBI) e revisão de literatura para gerar uma teoria sobre o potencial dos flavivírus de importância em saúde pública de atuar como agente de fator ambiental na causa de FOs. O *in silico* surgiu a partir da área da bioinformática, que utiliza softwares e dados (genomas, proteomas, transcriptomas) para a análise virtual dos sistemas biológicos, o que seria limitante para as metodologias científicas clássicas, considerando a quantidade de dados na era dos sequenciamentos. Esta análise computacional dos sistemas biológicos consegue auxiliar no processamento da quantidade de dados gerados, sendo inviável para o pesquisador analisar um genoma a mão ou com experimentos moleculares isolados e que muitas vezes exigem equipamentos e insumos laboratoriais caros, que ao final da investigação geram resultados parciais ou até mesmo inconclusivos sobre a hipótese investigada (VERLI, 2014).

Por se tratar de uma entidade clínica, de etiologia multifatorial, as FOs possuem lacunas que ainda não estão definidas sobre a possibilidade e o potencial dos flavivírus de importância em saúde pública, atuarem como agentes teratogênicos dessas alterações. Considerando a importância dessas infecções virais e o acréscimo das pesquisas de etiologia das FOs, justificou-

se a realização da investigação *in silico* do potencial dos flavivírus de causarem FOs, a fim de contribuir para o melhor entendimento sobre potenciais agentes envolvidos na etiologia e consequentemente reforçar a necessidade de melhores estratégias de controle e prevenção.

2 *Objetivos*

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Realizar pesquisa *in silico* de flavivírus de importância em saúde pública e seu potencial como agentes etiológicos de fissuras orofaciais não sindrômicas.

2.2 OBJETIVO ESPECÍFICO

Realizar pesquisa *in silico* para verificar o potencial dos flavivírus emergentes no Brasil como agentes etiológicos de fissuras orofaciais não sindrômicas.

3

Relação entre os Artigos

3 RELAÇÃO ENTRE OS ARTIGOS

3.1 Malformações congênitas

Malformações congênitas são definidas como anomalias estruturais e/ou funcionais que ocorrem durante a vida intrauterina. Aproximadamente 50% de todas malformações não possuem uma causa específica, muitas são consideradas como doença complexa tendo relação com diversos fatores de risco (WHO, 2020). São fatores etiológicos relacionados as malformações congênitas:

Genética: Mutações em genes específicos e consanguinidade estão relacionados às malformações, sendo que o último pode dobrar as chances de morte, desordens intelectuais e aparecimento de anomalias (WHO, 2020).

Fatores socioeconômicos e demográficos: Aproximadamente 94% das malformações severas ocorrem em países subdesenvolvidos. Essa estimativa pode estar relacionada a precariedade de saneamento básico, condições nutricionais e eficácia do sistema de saúde. A idade da mãe durante a gestação, também é um fator relevante para a investigação etiológica das malformações (WHO, 2020).

Fatores ambientais: Exposição da mãe a pesticidas e outros produtos químicos, drogas lícitas e ilícitas e radiação também aumentam consideravelmente o risco de malformações (WHO, 2020).

Infecções: Exposição a certas infecções durante o período gestacional está relacionado ao risco de malformações, como exemplo mais atual podemos citar a síndrome congênita causada pelo ZIKV (WHO, 2020).

Muitas malformações podem ser tratadas com correções cirúrgicas e quanto a desordens sanguíneas o tratamento medicamentoso desde cedo pode melhorar a qualidade de vida do paciente. Uma das principais formas de prevenção, associada a presente tese, é o *screen* de agentes etiológicos associados às malformações durante a gestação e/ou durante o planejamento para engravidar e a educação dos profissionais da saúde sobre os fatores de risco, envolvidos na patologia complexa da maioria das malformações congênitas (WHO, 2020).

3.1.1 Fissuras orofaciais

Fissuras orofaciais são caracterizadas como fendas ou aberturas que usualmente ocorrem no lábio e/ou palato. Sendo uma das malformações mais comuns, acometendo 1 em

cada 700 nascidos vivos, porém essa prevalência pode variar entre as diferentes etnias sendo maior respectivamente nos indivíduos de ascendência asiática (1 em cada 440 nascimentos), seguidos de caucasóides (1 em cada 650 nascimentos) e negros (1 em cada 2 mil nascimentos) (DIXON, 2011; FREITAS *et al.*, 2012).

A formação das fissuras orofaciais pode ocorrer até a 12^a semana de vida intrauterina, seguindo a ordem de formação embriológica, porque a face está pronta logo no início da gestação. Após tal período apenas se adapta a proporção ao crânio e ao corpo (SILVA FILHO; FREITAS, 2007; FREITAS *et al.*, 2012). Independente de qual processo embriológico seja afetado, a etiologia das fissuras orofaciais ocorre por falta de fusão tecidual, ou seja, há uma transformação em nível molecular que altera a biologia celular, prejudicando assim sua diferenciação, multiplicação e migração (OWENS; JONES; HARRIS, 1985; LOFFREDO; FREITAS; GRIGOLLI, 2001).

A formação embriológica do lábio e do palato ocorre a partir dos dois primórdios principais, o palato primário que dá origem a estruturas centrais, como columela nasal, filtro e tubérculo labial, pré-maxila. E por sua vez o palato secundário que origina os processos palatinos. O referencial anatômico de separação dos dois primórdios é o forame incisivo, como apresentado na Figura 1 (SILVA FILHO; FREITAS, 2007; FREITAS *et al.*, 2012).

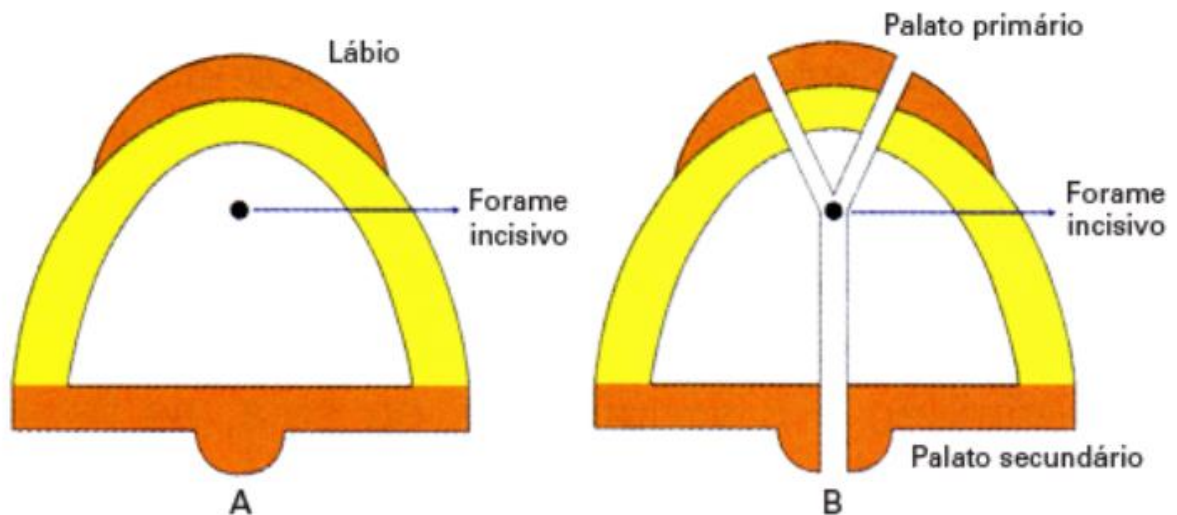


Figura 1. Representação da Maxila e do Forame Incisivo.

Legenda: A – O forame incisivo como referência anatômica, B – A formação embriológica da maxila.

Fonte: HRAC/USP, 2021.

A morfologia das FOs foi classificada em quatro grupos por Spina e colaboradores (1972) utilizando o forame incisivo como ponto principal, com isso é possível elucidar sua origem embriológica.

Grupo I: Composto por fissuras pré-forame incisivo, podendo ser unilaterais (direita ou esquerda), bilateral ou mediana. Se toda a extensão do palato primário ao forame incisivo for afetado pela fissura são chamadas de completas, do contrário incompletas. Apresentadas como fissuras do palato primário na Figura 2 (SILVA FILHO; FREITAS, 2007).

Grupo II: Integra as fissuras transforame incisivo que afetam o palato primário e secundário, também subdivididas em unilateral (direita ou esquerda), bilateral ou mediana. Apresentadas como fissuras do palato primário e secundário na Figura 2 (SILVA FILHO; FREITAS, 2007).

Grupo III: Compõem as fissuras pós-forame incisivo que afetam o palato secundário e de acordo com sua extensão até o forame incisivo são chamadas de completa ou incompleta. Apresentadas como fissuras do palato secundário na Figura 2 (SILVA FILHO; FREITAS, 2007).

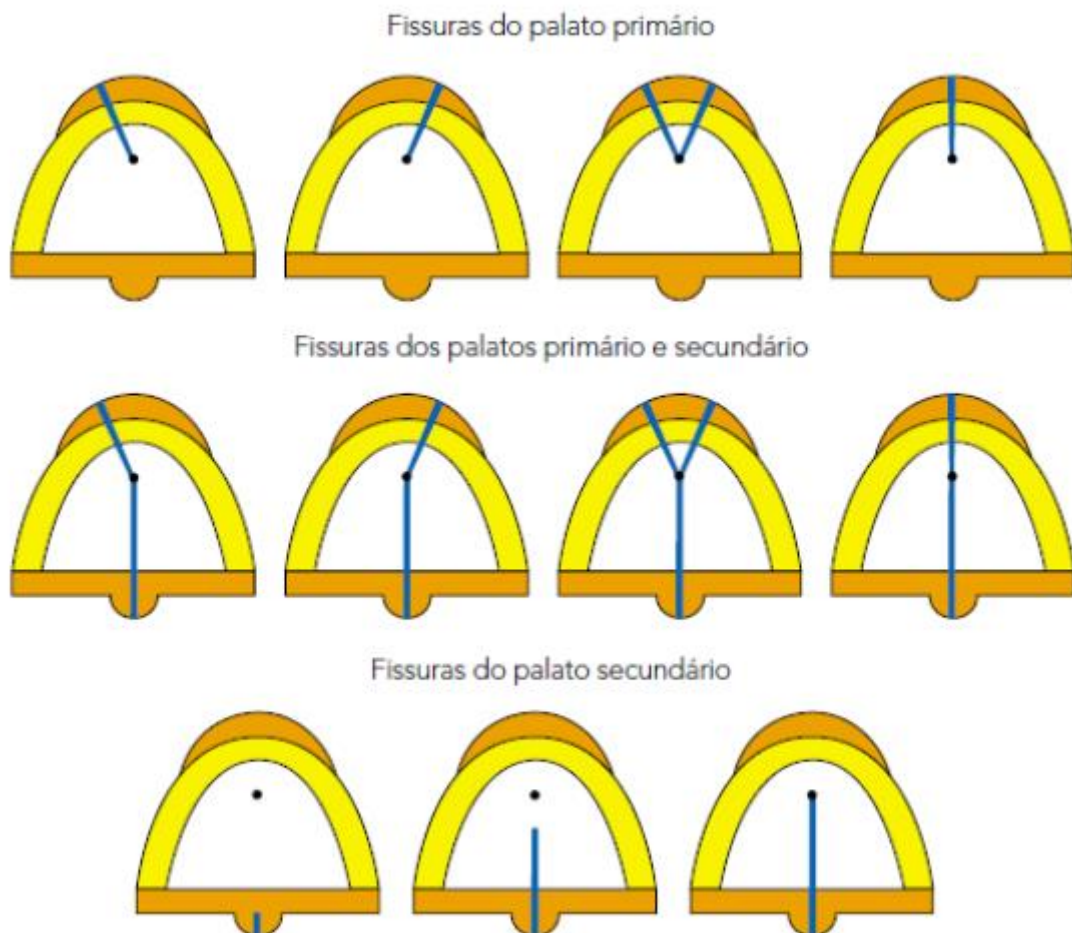


Figura 2. Representação dos Grupos I, II e III de Spina e colaboradores (1972).

Legenda: Fissuras do palato primário – Grupo I (Fissuras pré-forame incisivo), Fissuras dos palatos primário e secundário – Grupo II (Fissuras transforame incisivo), Fissuras do palato secundário – Grupo III (Fissuras pós-forame incisivo).

Fonte: SILVA FILHO; FREITAS, 2007.

Grupo IV: Inclui as fissuras raras da face que podem afetar bochecha, ossos da face e do crânio, pálpebras, orelha e nariz (SILVA FILHO; FREITAS, 2007).

A reabilitação física e funcional das FOs dependem de seu tipo, com intervenções cirúrgicas, fonoaudiológicas, odontológicas e psicológicas em tempos oportunos considerando o crescimento e qualidade de vida do paciente. A classificação de Spina e colaboradores (1972) e todas as intervenções de reabilitação do paciente com fissura orofacial são utilizadas no Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC/USP), o qual por sua vez é referência internacional na reabilitação de FOs (HRAC/USP, 2021).

3.2 Vírus

Os vírus recentemente foram definidos pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) como elementos genéticos móveis constituídos de ao menos uma proteína que encapside um ácido nucleico e este último deve ter em seu código as instruções moleculares para a síntese de suas proteínas (ICTV, 2021b). Historicamente caracterizados por passar em filtros que retêm bactérias, esse grupo numeroso de organismos podem infectar todos os demais seres vivos, manipulando a célula hospedeira de acordo com suas necessidades biológicas (CONDIT, 2013).

A classificação criada por David Baltimore é comumente utilizada para ordenar a grande variedade genética dos vírus e tem por base o tipo de material genético e seu caminho molecular, culminando no ácido ribonucleico mensageiro (BALTIMORE, 1971), como demonstrado na Figura 3.

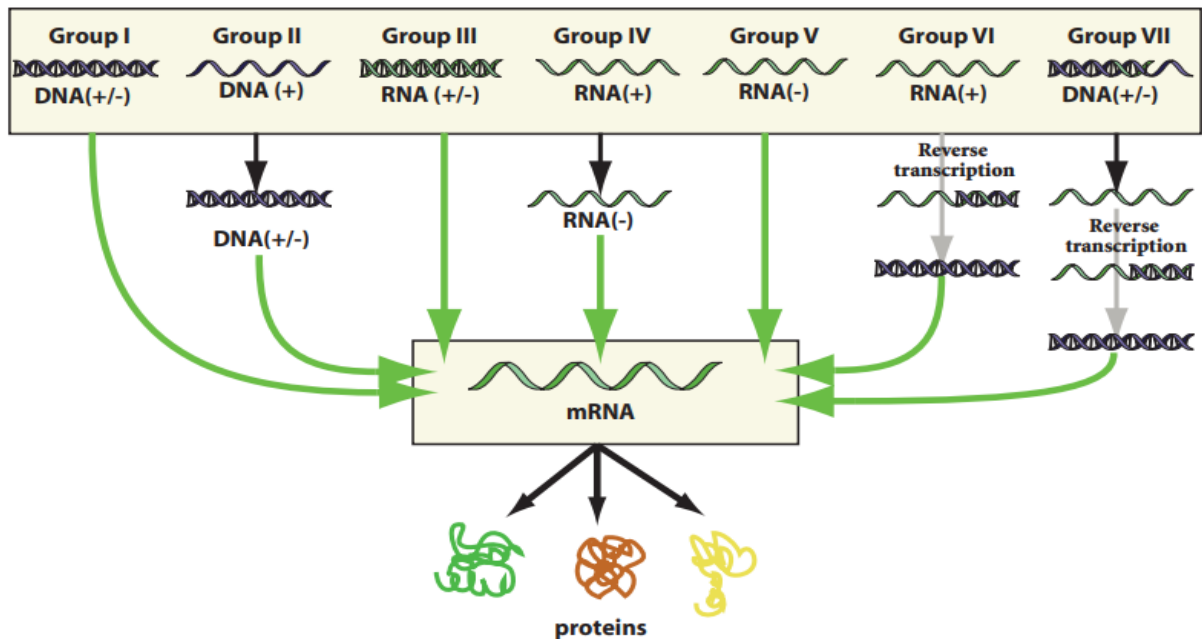


Figura 3. Classificação de Baltimore.

Legenda: *Group* – Grupo, DNA – Ácido desoxirribonucleico, RNA – Ácido ribonucleico, + – Sentido de leitura 5'-3', - – Sentido de leitura 3'-5', *Reverse Transcription* – Transcrição reversa, *mRNA* – Ácido ribonucleico mensageiro, *Proteins* – Proteínas.

Fonte: HULO *et al.*, 2011.

Os vírus precisam introduzir suas coordenadas genéticas na célula hospedeira e manipular a maquinaria celular para a sua replicação, também chamada de biossíntese viral (HELENIUS, 2013). Para que isso ocorra existem etapas moleculares essenciais:

Adsorção: O vírion se conecta aos receptores celulares, algumas ligações químicas nessa etapa podem ser reversíveis, dependendo das constituições químicas do processo (HELENIUS, 2013).

Penetração: A passagem da partícula viral pela membrana citoplasmática pode ocorrer de variáveis formas, a depender da estratégia viral e do receptor utilizado na etapa anterior (HELENIUS, 2013), um exemplo pode ser observado na Figura 4.

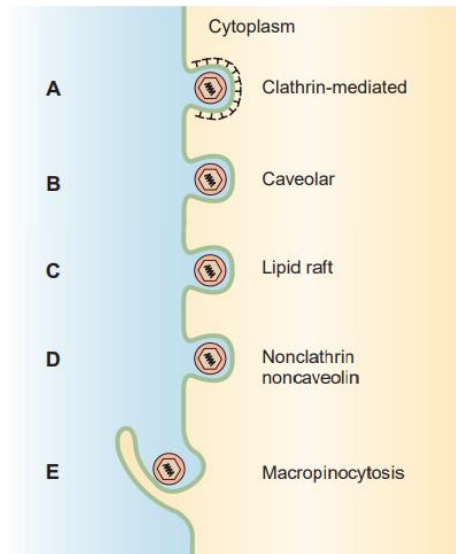


Figura 4. Mecanismos de Penetração Viral.

Legenda: *Cytoplasm* – Citoplasma, **A** – Endocitose mediada por clatrina, **B** – Endocitose mediada por caveolina, **C** – Endocitose mediada por jangada lipídica, **D** – Endocitose não mediada por clatrina e caveolina, **E** – Macropinocitose.

Fonte: HELENIUS, 2013.

Desnudamento: Em vírions, que infectam células animais, esse processo ocorre majoritariamente por acidificação da partícula viral no endossomo, então as mudanças conformacionais ocorridas, ocasionam a liberação do material genético viral (HELENIUS, 2013).

Replicação: O processo de replicação viral tem por objetivo copiar o próprio genoma viral e utilizar os mecanismos de síntese proteica do hospedeiro para a criação das proteínas estruturais que irão compor as novas partículas virais, para isso é necessário que o vírion utilize enzimas próprias e do hospedeiro para guiar o processo molecular até o RNAm (WHELAN, 2013). Para ilustração desse processo, na Figura 5 é apresentado um esquema básico de replicação de vírus constituídos de DNA e na Figura 6 de RNA.

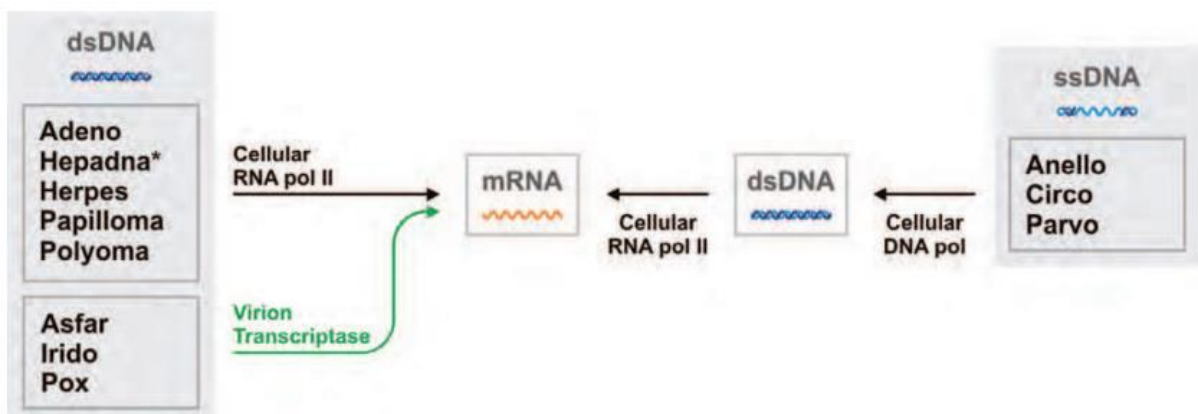


Figura 5. Replicação de Vírus de Ácido Desoxirribonucleico (DNA).

Legenda: *dsDNA* – Ácido Desoxirribonucleico de fita dupla, *ssDNA* – Ácido Desoxirribonucleico de fita simples, *Cellular RNA pol II* – Polimerase II, *Virion Transcriptase* – Transcriptase viral, *mRNA* – Ácido Ribonucleico mensageiro.

Fonte: WHELAN, 2013.

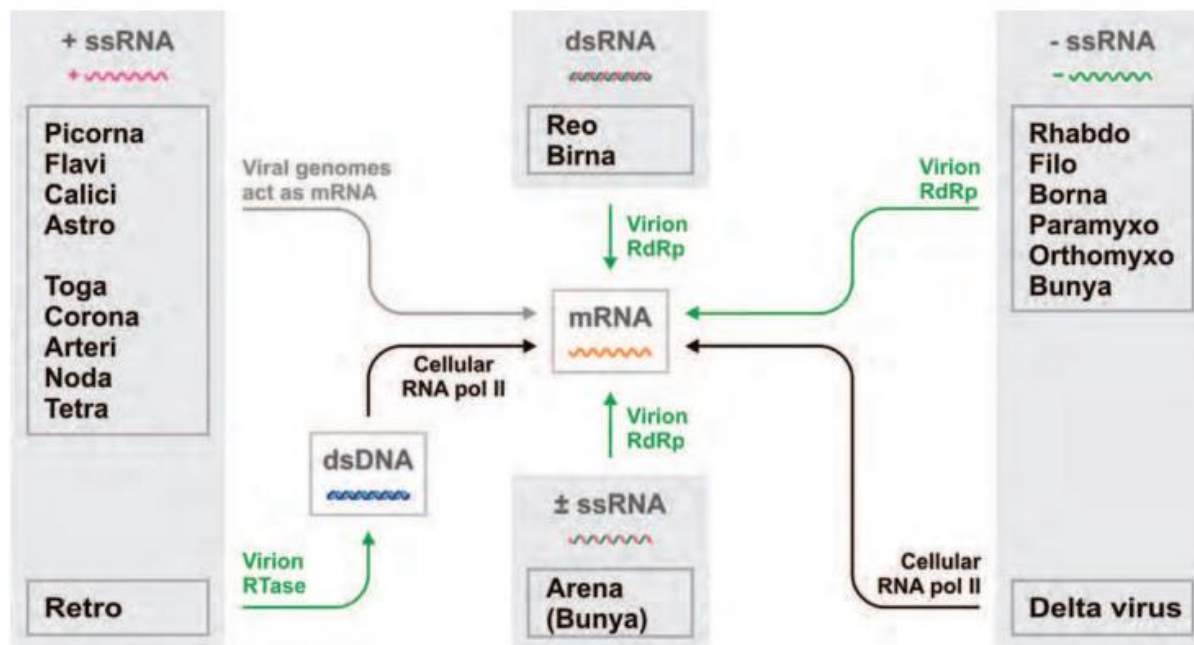


Figura 6. Replicação de Vírus de Ácido Ribonucleico (RNA).

Legenda: *+ssRNA* – Ácido Ribonucleico de fita simples com polaridade positiva, *dsRNA* – Ácido Ribonucleico de fita dupla, *±ssRNA* – Ácido Ribonucleico ambisenso, *-ssRNA* – Ácido Ribonucleico de fita simples com polaridade negativa, *dsDNA* – Ácido Desoxirribonucleico de fita dupla, *Cellular RNA pol II* – Polimerase II, *Virion RTase* – Transcriptase Reversa, *Virion RdRp* – RNA polimerase RNA dependente, *mRNA* – Ácido Ribonucleico mensageiro.

Fonte: WHELAN, 2013.

Brotamento: O processo de saída dos vírions é variável da espécie viral e se o vírion possui envelope ou não. O envelope viral é constituído de uma bicamada fosfolipídica derivada da membrana citoplasmática ou de membranas de organelas. A saída do vírion da célula dá início novamente ao ciclo de infecção e pode trazer danos irreversíveis, seja por lise ou exaustão (HUNTER, 2013). As diversas vias de brotamento viral estão representadas na Figura 7.

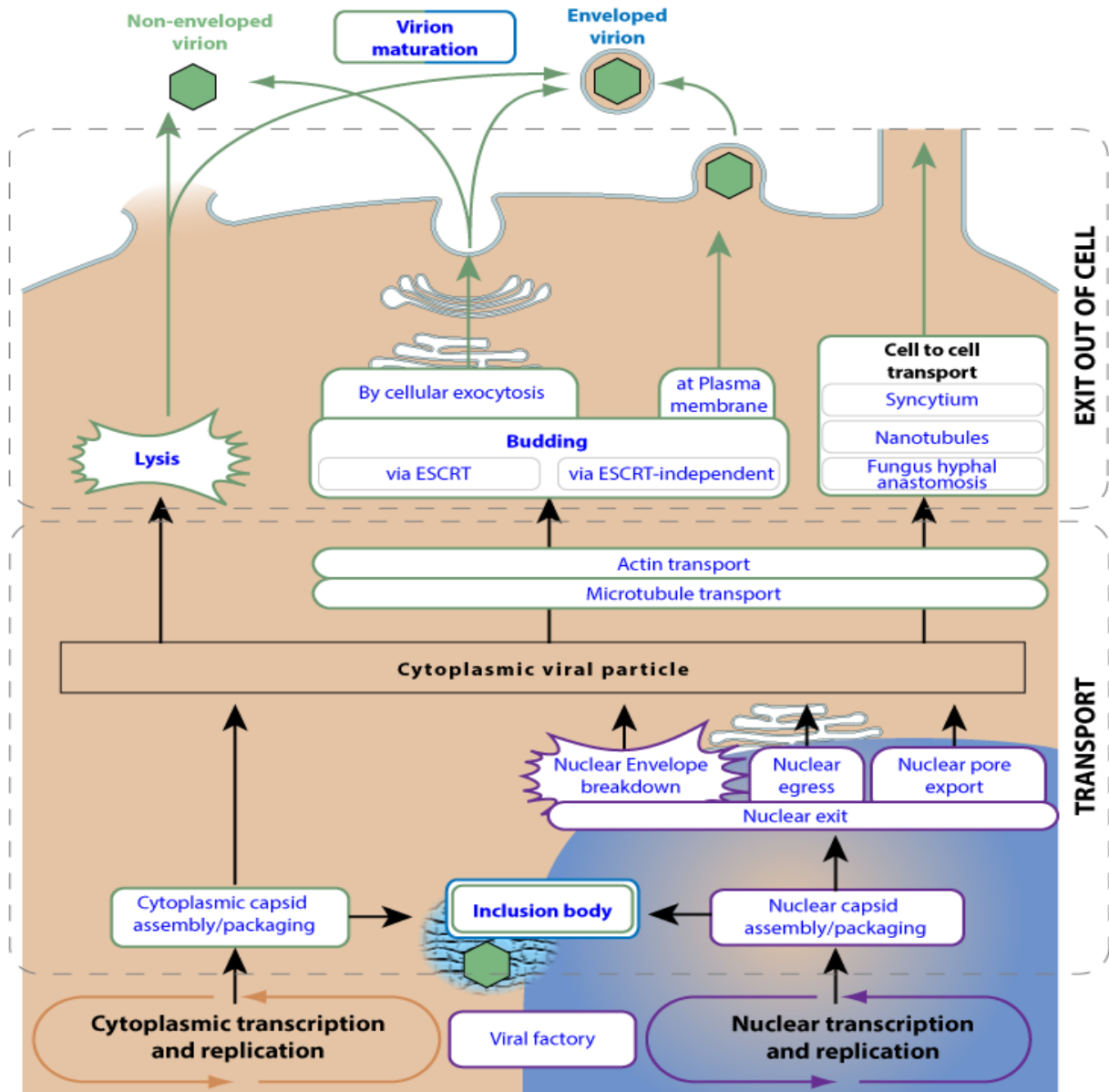


Figura 7. Brotamento Viral.

Legenda: *Cytoplasmatic transcription and replication* – Transcrição e replicação citoplasmática, *Viral factory* – Fábrica viral, *Nuclear transcription and replication* – Transcrição e replicação nuclear, *Cytoplasmic capsid assembly/packaging* – Montagem citoplasmática do capsídeo, *Inclusion body* – Corpo de inclusão, *Nuclear capsid assembly/packaging* – Montagem nuclear do capsídeo, *Nuclear exit* – Saída do núcleo, *Nuclear Envelope breakdown* – Quebra do Envelope Nuclear, *Nuclear egress* – Saída do núcleo, *Nuclear pore export* – Exportação via poro nuclear, *Transport* – Transporte, *Cytoplasmic viral particle* – Partícula viral no citoplasma, *Microtubule transport* – Transporte via microtubulos, *Actin transport* – Transporte via actina, *Lyses* – Lise, *Budding* – Brotamento, *via ESCRT* – Complexos de endossomos de transporte, *via ESCRT-independent* – Via independente de complexos de endossomos de transporte, *by cellular exocytoses* – Por exocitose celular, *at Plasma Membrane* – Na Membrana Citoplasmática, *Fungus hiphal anastomosis* – Via rede de hifas (via presente apenas em fungos), *Nanotubules* – Nanotubos de Membrana, *Syncytium* – Sincício, *Cell to cell transport* – Transporte direto de célula a célula, *Exit out of cell* – Saída da célula, *Virion maturation* – Maturação do vírion, *Enveloped virion* – Vírion envelopado, *Non-enveloped virion* – Vírion não envelopado.

Fonte: HULO *et al.*, 2011.

A chance da presença do vírus no tecido celular hospedeiro trazer dano são dependentes de diversas e complexas variáveis, como o estado nutricional, idade e sexo do hospedeiro, suscetibilidade e permissividade celular, a capacidade regenerativa das células infectadas, como o sistema imune irá responder a infecção, se a espécie viral propicia infecções residuais e/ou crônicas. O potencial de dano pode envolver morte celular, efeitos citopáticos (alterações de morfologia, fisiologia, diferenciação e multiplicação) que podem levar a inúmeras patologias, como problemas vasculares, distúrbios hormonais, distúrbios relacionados ao desequilíbrio de citocinas (o que pode levar a morte de células não infectadas), indução de febre, caquexia, alteração de fluídos e eletrólitos, formação de tumores e indução de distúrbios autoimunes. O dano celular pode ser ocasionado de forma direta pela biossíntese viral e/ou de forma indireta pelo ataque do sistema de defesa do hospedeiro, além de que a interação viral com a genética do hospedeiro também é evidente, podendo ativar fenótipos e interagir com diversas cascatas gênicas. Independente da forma que a replicação dos vírions ocorrem, sua interação com a célula hospedeira deve ser considerada no mínimo dinâmica (HEISE; VIRGIN, 2013). Para exemplificar essa dinâmica relação entre vírus e célula, a Figura 8 apresenta um esquema de alterações celulares presentes na infecção por um papiloma vírus.

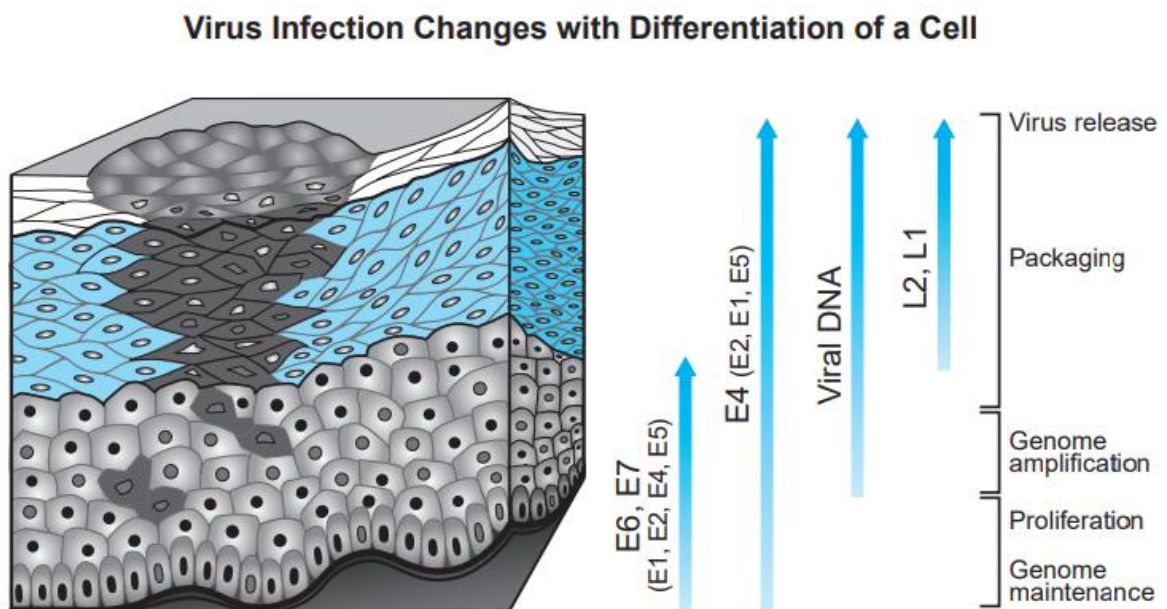


Figura 8. Dinâmica de Interação Vírus-Células com o Exemplo de Papiloma Vírus.

Legenda: *Virus Infection Changes with Differentiation of a Cell* – Mudanças na infecção viral com a diferenciação celular, *Genome maintenance* – Manutenção do genoma, *Proliferation* – Proliferação, *Genome amplification* – Amplificação do genoma, *Packaging* – Empacotamento, *Virus release* – Brotamento viral, *E1-E7*, *L1*, *L2* – Genes virais – *Viral DNA* – Ácido desoxirribonucleico viral.

Fonte: HEISE; VIRGIN, 2013.

3.2.1 Flavivírus

O gênero *Flavivirus* possui 53 espécies em sua taxonomia. É membro da família *Flaviviridae*, ordem *Amarillovirales*, classe *Flasuviricetes*, filo *Kitrinoviricota*, domínio *Orthornavirae* e reino *Riboviria* (ICTV, 2021a). Esses vírions integram a classe 4 da escala de Baltimore com um genoma RNAs+ circundado por um capsídeo icosaédrico e um envelope fosfolipídico como demonstrado na Figura 9 (PERSON, LAZEAR, DIAMOND, 2020).

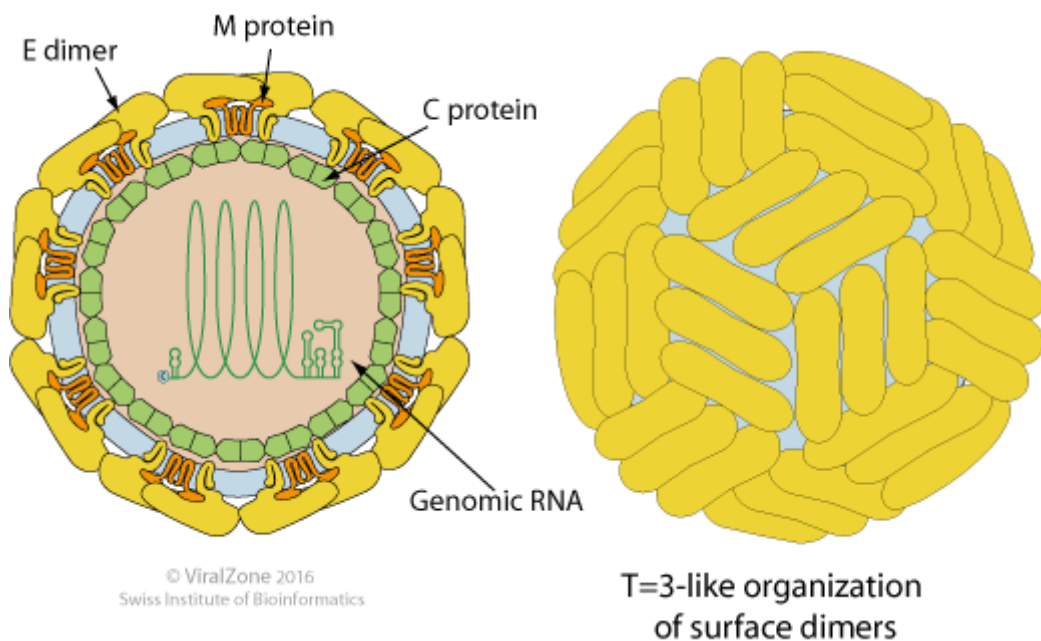


Figura 9. Representação do Vírion do Gênero *Flavivirus*.

Legenda: Em verde no interior do icosaedro é apontado o ácido ribonucleico genômico (*Genomic RNA*) circundado pelo capsídeo formado pela proteína C (*C protein*) também representada em verde. Em azul claro é representado o envelope fosfolipídico adquirido no retículo endoplasmático durante a biossíntese viral. Em laranja é representado a proteína de membrana (*M protein*) que serve de ancoragem para os dímeros de proteína do envelope (*E dimer*) representados pela cor amarela formando um arranjo molecular em tríade na superfície do vírion (*T=3-like organization of surface dimers*).

Fonte: HULO *et al.*, 2011.

Durante sua biossíntese seu genoma é traduzido em uma poliproteína posteriormente clivada por enzimas celulares e virais nas proteínas estruturais C, prM, E e nas proteínas não estruturais NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 apresentado na Figura 10 (PERSON, LAZEAR, DIAMOND, 2020).

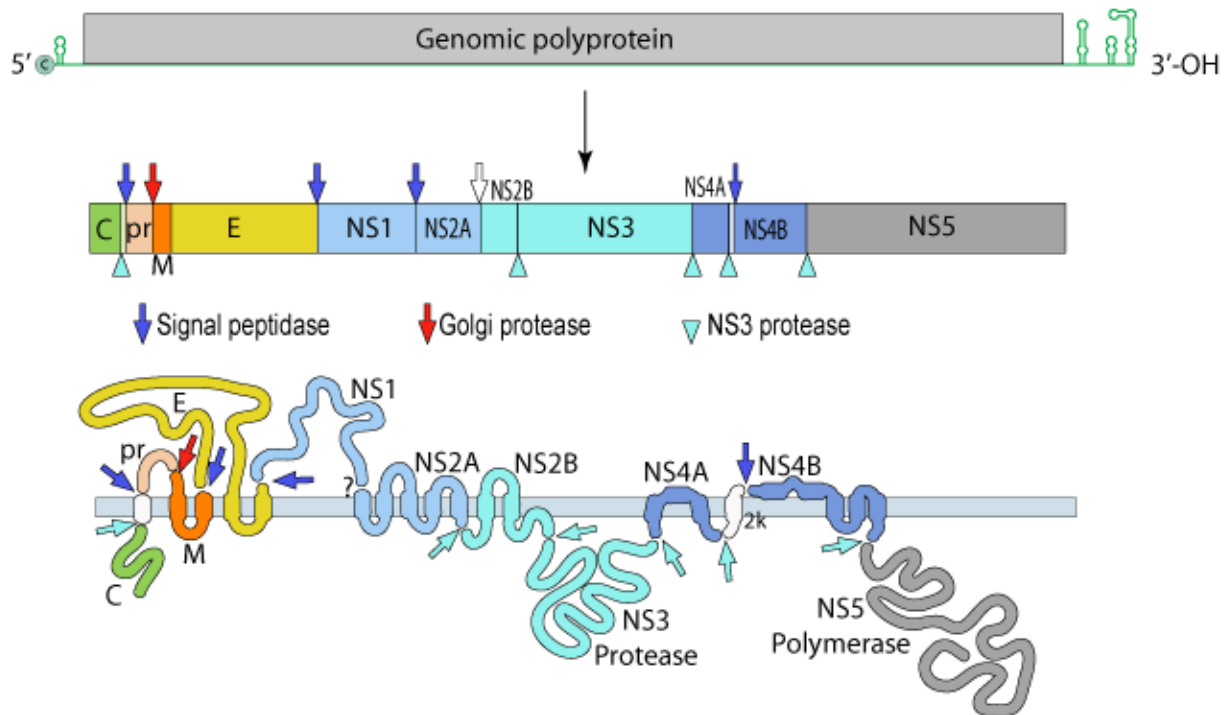


Figura 10. Representação da Tradução de Proteínas dos Flavivírus.

Legenda: O ácido ribonucleico de fita simples com polaridade positiva dos flavivírus possuem uma única região aberta de leitura, por sua vez traduzida em uma poliproteína posteriormente clivada por enzimas celulares (*Signal peptidase* e *Golgi protease*) e viral (*NS3 protease*). A clivagem da poliproteína gera as proteínas estruturais Capsídeo (C), pré-Membrana (prM), Envelope (E) e as proteínas não estruturais 1, 2A, 2B, 3, 4A, 4B e 5.

Fonte: HULO *et al.*, 2011.

Quando um flavivírus se adere a uma célula susceptível e permissiva, ocorre endocitose mediada por clatrina seguida de acidificação pelo endossomo, a fusão de membranas fosfolipídicas ocorre por pH-dependente liberando o genoma no citoplasma celular. O genoma viral se adere ao retículo endoplasmático (RE) onde segue a tradução, replicação e montagem. Para o brotamento, o vírion é encaminhado via aparelho de Golgi (AG) sofrendo maturação pela clivagem da pr e é liberado no meio extracelular para continuar seu ciclo. Durante a biossíntese dos flavivírus é frequentemente observado o rearranjo de membranas celulares para atender sua alta demanda de produção, transporte e liberação viral (Figura 11) (PERSON, LAZEAR, DIAMOND, 2020).

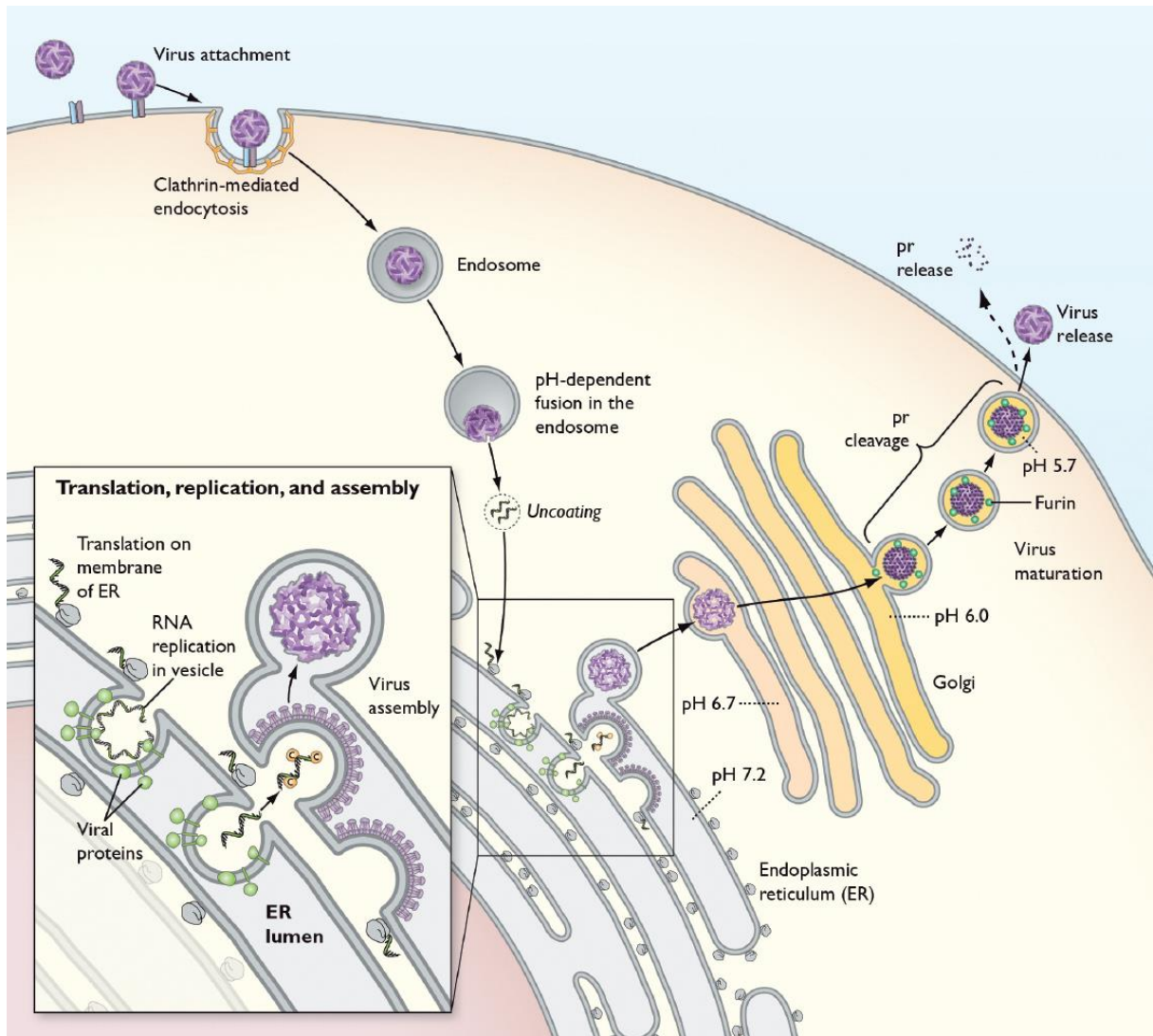


Figura 11. Biossíntese dos Flavivírus.

Legenda: A entrada do vírion é por endocitose mediada por clatrina (*Clathrin-mediated endocytosis*) seguido de desnudamento (*Uncoating*) mediado por fusão no endossomo (pH-dependente). A tradução ocorre na membrana do retículo endoplasmático (ER). O genoma é replicado em uma vesícula que possua proteínas virais de estabilização do ácido ribonucleico viral, e por sua vez, a montagem onde o envelope é derivado da membrana do retículo endoplasmático. O transporte é realizado pelo aparelho de Golgi com dependência de pH. Pouco antes do brotamento o vírion sofre maturação pela furina (*Furin*) celular ao clivar a proteína estrutural pré-Membrana em proteína estrutural Membrana. O vírion é então liberado no meio extracelular junto com os resquícios do processo de maturação (*pr release*).
Fonte: PERSON, LAZEAR, DIAMOND, 2020.

A maioria dos flavivírus são transmitidos por artrópodes, o que os definem também como arbovírus (*arthropod-borne virus*), causando de forma variável desde sintomas febris e articulares a encefalites e febres hemorrágicas (PIERSON, DIAMOND, 2013). Os flavivírus geralmente possuem tropismo por vísceras e a derme é o local inicial da infecção devido ao suprimento alimentar sanguíneo dos artrópodes. As células inicialmente infectadas são

queratinócitos e dendríticas (LIM *et al.*, 2011). O repasto sanguíneo do artrópode libera de 10^3 a 10^5 UFP (unidades formadoras de plaques) (SCHNEIDER *et al.*, 2006). A defesa inata do hospedeiro é suprimida por proteínas da saliva do artrópode aumentando a replicação viral no local da picada e facilitando a chegada dos vírus no linfonodo (SCHNEIDER, HIGGS, 2008) e deste se inicia a viremia. A capacidade neurotrópica dos flavivírus depende da duração de viremia, fatores de virulência e condições do sistema de defesa do hospedeiro, por sua vez todas essas características são variáveis de determinantes genéticas virais e do hospedeiro que em sua maior parte seguem desconhecidas (LINDENBACH *et al.*, 2013).

3.3 Bioinformática

Análises que utilizam as variadas metodologias da área de bioinformática são também chamadas de método *in silico*, que significa por meio de uma simulação computacional, acompanhando em mesmo grau de evidência os métodos *in vitro* e *in vivo*, pois também possui modelos estatísticos robustos para comprovar ou refutar as hipóteses investigadas. É claro que o método científico denota a complementariedade de diferentes formas de evidência sobre o ponto investigado, e o método *in silico* funciona como mais uma peça do quebra-cabeça e uma peça essencialmente relevante para a exclusão de pesquisas *in vitro* e *in vivo* que seriam no mínimo redundantes ou até desnecessárias. Podemos exemplificar da seguinte forma, se seu experimento *in silico* gerou um resultado estatisticamente relevante e que a droga que está testando não funciona para a finalidade buscada em sua hipótese, porque então utilizar os métodos *in vivo* e *in vitro* para investigar a mesma coisa? Considerando que os métodos *in silico*, para predição de interação molecular, são atualmente referenciais para produção de novos medicamentos (UT, 2020).

Os dados gerados com os experimentos *in vitro* são no mínimo dinâmicos e essa complexidade muda de cenário dependendo de qual é o foco estudado “genoma, transcriptoma, proteoma, metaboloma”. Do genoma ao metaboloma é necessário o uso de inúmeros softwares e combinações de algoritmos diferentes para a análise de dados. E esse cenário de possibilidades no método *in silico* está em constante expansão, podendo se estudar em diversos aspectos, como por exemplo, predizer sua história evolutiva e algumas vezes até estimar há quanto tempo tal processo de divergência ocorreu, como determinada proteína pode interagir em uma via metabólica, ou como um gene alterado pode interferir em toda cascata gênica de determinado processo, busca por homologias, similaridades, etc... (UT, 2020).

Seguindo a linha de exemplificação citada anteriormente, a pesquisa de Calligari e colaboradores (2020) utilizou softwares de simulação de interação de proteínas que investigaram o potencial dos fármacos antivirais contra o Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2 (SARS-CoV-2) evidenciando regiões da proteína S susceptíveis (Figura 12), ressaltando ao final de seu trabalho, a importância dos estudos computacionais para entender interação molecular, no caso, com o objetivo de encontrar uma melhor terapêutica.

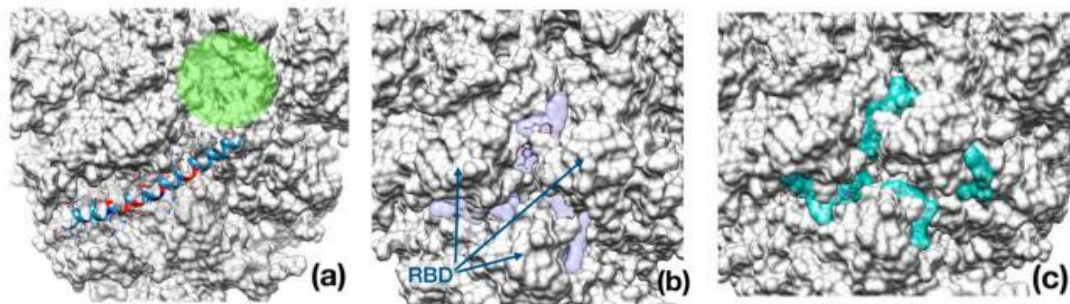


Figura 12. Simulação Computacional de Regiões da Proteína S do SARS-CoV-2 Potencialmente Suscetíveis a Antivirais.

Legenda: A – Enfuvirtida apresentada em fita ligada ao capeamento trimérico representado na região verde circular, B – Regiões de atração do Umifenovir apresentadas em violeta, entre os domínios de ligação do receptor (*RBD*), C – Na mesma região molecular que a imagem B, porém apresentando as regiões de atração do Pleconaril, SARS-CoV-2 - Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2.

Fonte: CALLIGARI *et al.*, 2020.

3.4 Justificativa

Com base no dinâmico controle que os vírus podem exercer sobre as células hospedeiras e suas possíveis consequências é plausível associarmos uma parte da etiologia ambiental das fissuras orofaciais as flaviviruses congênitas, pois estas envolvem o não funcionamento adequado das células, o que por sua vez, causa o não funcionamento tecidual. Utilizando simulação computacional em busca de similaridades (com dados de acesso público) e os dados existentes em literatura como base para formar a teoria, a presente tese busca iniciar um panorama de investigação inédito, utilizando flavivírus, de importância em saúde pública, tão presentes em nossa sociedade, e o seu potencial de causar fissuras orofaciais.

4

Artigos

4.1 Artigo 1

Artigo configurado de acordo com as normas do *The Cleft Palate-Craniofacial Journal*

O potencial dos flavivírus de importância em saúde pública como etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais não sindrômicas

Resumo

Objetivo: A proposta do presente estudo foi investigar o potencial dos flavivírus de importância em saúde pública como etiologia de fissuras orofaciais.

Métodos: Criamos para nossa análise um método de pontuação com sete tópicos baseado em literatura e experimentação *in silico* (doença, passagem transplacentária, tropismo, dano celular, caso relatado, análise de similaridade de genoma e transcriptoma entre vírus e hospedeiro), utilizando para obter os genomas virais, o *NCBI virus* e para as análises de similaridade o *BLAST 2.12.0* ajustado para buscar apenas sequências humanas relacionadas as fissuras orofaciais com o limiar estatístico definido para o *E-value* ≤ 1 .

Resultados: Os flavivírus de importância em saúde pública que apresentaram potencial alto de causar fissuras orofaciais foram os sorotipos 2, 3 e 4 da espécie *Dengue virus* e a linhagem 2 da espécie *West Nile virus*, enquanto o *Yellow fever virus*, *Japanese encephalitis virus*, *Tick-borne encephalitis virus* e *Saint Louis encephalitis virus* apresentaram potencial médio de causar fissuras orofaciais. Quanto ao *Zika virus*, mesmo cepas associadas a casos de microcefalia não apresentaram alto potencial relacionado as fissuras orofaciais, estas permanecendo com potencial médio.

Conclusão: Sugerimos que medidas de controle e prevenção sejam implementadas envolvendo as espécies *Dengue virus* e *West Nile virus*, que possuem alto potencial para atuarem como agentes etiológicos de fator ambiental em fissuras orofaciais.

Palavras-chave: Fenda labial, Fissura palatina, Flavivirus, Etiologia, Fissuras Orofaciais.

Introdução

As anomalias congênitas são consideradas um problema de saúde pública e afetam mundialmente aproximadamente 5% dos nascidos vivos, dentre as quais as alterações craniofaciais se destacam (Nagem, 1968; Souza, 1987; Nazer, 2001). Essas anomalias resultam

de alterações morfológicas no desenvolvimento embrionário. Possuem uma etiologia complexa e multifatorial com destaque a participação do fator ambiental e podem ser caracterizadas em anomalias isoladas e múltiplas, de etiologia genética associada a síndromes ou não (Monlleó, 2006). Entre as malformações craniofaciais mais comuns estão as fissuras orofaciais (FOs) acometendo de 0,2 a 0,9% a cada 1000 nascidos vivos (Owens, 1985; Loffredo, 2001). As FOs geram significativo impacto sobre a vida dos indivíduos por ela acometidos, afetando funções básicas como respiração, alimentação, fala e aparência. Influenciando diretamente a saúde do paciente (Amaral, 1996), bem como seu desenvolvimento social devido à estigmatização e exclusão (Chan, 2006). A formação das FOs ocorre no primeiro trimestre de gestação (até a 12ª semana da vida intrauterina) (Silva Filho; Freitas, 2007), neste período a alteração do processo embriológico natural pode acarretar danos anatômicos. A etiologia das FOs é definida pela ausência de fusão tecidual, ou seja, ocorrem alterações a nível molecular que altera a biologia celular, prejudicando os processos de diferenciação, multiplicação e migração das células que realizariam o fusão tecidual (Owens; Jones; Harris, 1985; Loffredo; Freitas; Grigolli, 2001).

Um dos fatores ambientais para a ocorrência de alterações embrionárias descrito na literatura são os vírus (Wigg *et al.*, 2013). Os vírus são organismos acelulares com comportamento parasitário a nível intracelular, possuindo RNA (Ácido ribonucleico) ou DNA (Ácido desoxirribonucleico). As viroses relacionadas a artrópodes e humanos são denominadas arboviroses “*arthropod borne viroses*”, consideradas como uma das principais classes de doenças infecciosas emergentes (Gubler, 2001). Esses agentes se multiplicam nos hospedeiros e nos artrópodes hematófagos e são transmitidos para novos vertebrados susceptíveis, através da picada do vetor infectado, recomeçando assim o ciclo epidemiológico (WHO, 1967; Moore *et al.*, 1993). No reino *Riboviria* (vírus de RNA), dentro da família *Flaviviridae* e gênero *Flavivirus* estão localizadas algumas das arboviroses de maior importância para saúde pública, como *Dengue virus* (DENV – Vírus da Dengue), *Yellow fever virus* (YFV – Vírus da Febre Amarela), *West Nile virus* (WNV – Vírus do Oeste do Nilo) e o *Zika virus* (ZIKV – Vírus Zika), que recentemente se tornou alvo de intensas pesquisas (WHO, 2016; ICTV, 2021a). Os membros do gênero *Flavivirus* são distribuídos por todo globo e são agentes etiológicos de diversas epidemias de difícil controle, por conta de suas características epidemiológicas dinâmicas (Mackenzie, Gubler, Petersen, 2004).

Por se tratar de uma entidade clínica de etiologia multifatorial as FOs possuem lacunas sobre a possibilidade e o potencial dos flavivírus de importância em saúde pública atuarem como agentes teratogênicos dessas alterações. Considerando a importância dessas infecções

virais e o acréscimo das pesquisas de etiologia das FOs, o objetivo desta pesquisa foi investigar por meio da literatura e da similaridade nucleotídica (Vírus e Hospedeiro) o possível potencial desses vírus de causarem FOs.

Material e Métodos

Para analisar a hipótese do potencial dos flavivírus causarem fissuras orofaciais foi desenvolvido um método de pontuação com sete perguntas (divididas em tópicos): I (**Doença**) – O vírus causa doença? (Considerando presença de sintomas igual e/ou acima de 30% dos infectados). Se sim o vírus ganha a pontuação 1, se não 0; II (**Transplacentária**) – O vírus pode atravessar a barreira transplacentária? Se negativo o vírus ganha pontuação 0, caso positivo o vírus ganha a pontuação 2, se a passagem pela barreira transplacentária nunca foi investigada para o vírus ele ganha a pontuação 1; III (**Viremia**) – No ciclo biológico viral ocorre viremia? (Considerando apenas ciclos biológicos clássicos). Caso positivo o agente ganha pontuação 1, negativo, pontuação 0; IV (**Tropismo**) – O vírus possui tropismo por células da face e/ou progenitoras? Se positivo é concedido pontuação 2, se negativo pontuação 0 e caso não tenha sido investigado pontuação 1; V (**Dano celular**) – Durante a replicação viral ocorre dano intra e/ou extra celular? (Foi considerado dano celular quanto a presença de lise, rearranjo de organelas, supressão total de proteínas celulares, alteração molecular do meio extracelular e qualquer outra alteração estrutural celular irreversível. Usando como base o ciclo biológico clássico do vírus). Se não ocorre dano celular, o vírus terá a pontuação 0, se houver dano intra celular ganhará +1, se houver dano extra celular ganhará +1. VI (**Similaridade**) – O vírus possui similaridade nucleotídica com sequências humanas associadas a fissuras orofaciais? (Para obter os dados de similaridade foi utilizado o software *BLAST 2.12.0*). Para cada *match* o vírus ganha +1, para cada resultado duplicado foi aplicado -1; VII (**Caso relatado**) – O vírus possui caso relatado em literatura associando-o a fissuras orofaciais? Caso negativo recebe a pontuação 0, se positivo a pontuação pode ser 1 (diagnóstico da presença viral apenas por clínica), 2 (diagnóstico com exames laboratoriais que detectam antígeno e/ou anticorpo relacionado ao vírus) ou 3 (diagnóstico com base em detecção de material genético viral por reação da cadeia de polimerase e/ou cultivo viral).

Os tópicos I, II, III, IV, V e VII foram respondidos por meio de uma análise integrativa da literatura através das bases de dados SciELO, PubMed, MEDLINE, LILACS e Google Acadêmico afim de ter uma maior quantidade de resultados.

O tópico VI foi respondido utilizando o software *Basic Local Alignment Search Tool – BLAST 2.12.0* (Altschul *et al.*, 1997). Para a busca de similaridade com sequências humanas associadas a fissuras orofaciais foi selecionado o banco de dados *Genomic + transcript databases (Human genomic plus transcript human G+T)*. Foram utilizados três *Entrez query* como filtro de sequências humanas “*Orofacial cleft*”, “*Cleft lip*” e “*Cleft palate*”. Os programas *megablast*, *discontiguous megablast* e *blastn* foram rodados com o limiar estatístico *E-value* ajustado para considerar apenas resultados ≤ 1 .

As sequências virais utilizadas no tópico VI foram obtidas no *National Center for Biotechnology Information Virus - NCBI Virus* (Hatcher *et al.*, 2017). Selecionamos apenas genomas completos e referenciais (com exceção as cepas). Para a verificação de função dos genes e transcritos observados na similaridade se utilizou o catálogo online de genes humanos e doenças genéticas *OMIN[®] (Online Mendelian Inheritance in Man)* (Hamosh, 2021) e a base de dados genético do *GeneCards[®]: The Human Gene Database* (Stelzer, 2021).

Os vírus selecionados para validar o método de pontuação de avaliação do potencial de causar FOs foram *Rubivirus rubellae* (RBV – Vírus da Rubéola), *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1 – Vírus Herpes Simplex 1), *Zika vírus* (ZIKV) e constituíram este controle por pertencerem ao grupo das infecções do acrônimo STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples), grupo este já consolidado na literatura por causarem malformações (inclusive craniofaciais e FOs) (Roizman, Knipe, Whitley, 2013; Hobman, 2013), e no caso do *Zika vírus* por ser um dos principais *Flavivirus* com relação a doença congênita, confirmado através dos casos de síndrome congênita do ZIKV (qual manifestação clínica predominante é a microcefalia) (ICTV, 2021; Pierson, Lazear, Diamond, 2020; WHO, 2016). O RBV apresentou pontuação 14 (em vermelho na Tabela 1) e foi definido como limiar para o potencial alto de causar fissuras orofaciais, o HHV-1 obteve pontuação 7 (em verde na Tabela 1) e portanto considerado baixo potencial de causar fissuras orofaciais. Como limiar médio foi definido o ZIKV com a pontuação 10 (em amarelo na Tabela 1).

Resultados

A Tabela 1 apresenta as pontuações dos flavivírus de importância em saúde pública quanto ao seu potencial de causar fissuras orofaciais.

Tabela 1. O potencial dos flavivírus de importância em saúde pública de causar fissuras orofaciais, 2021.

TÓPICO/VÍRUS	RBV	ZIKV	HHV-1	DENV-1	DENV-2	DENV-3	DENV-4	YFV	WNV-1	WNV-2	JEV	SLEV	TBEV	ZIKV-PA	ZIKV-CE	ZIKV-BE
I (Doença)	1 ¹	1 ³	0 ⁵	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	0 ³	0 ³	0 ³	0 ³	0 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³
II (Transplacentar)	2 ¹	2 ³	2 ⁵	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁷	2 ⁹	2 ³	2 ³	2 ¹²	1	0 ¹⁴	2 ³	2 ³	2 ³
III (Viremia)	1 ¹	1 ³	0 ⁵	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³	1 ³
IV (Tropismo)	2 ¹	2 ³	2 ⁵	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ⁸	2 ¹⁰	2 ³	2 ³	2 ¹³	1	1	2 ³	2 ³	2 ³
V (Dano celular)	2 ¹	2 ³	0 ⁵	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³	0 ³	0 ³	2 ³	2 ³	2 ³	2 ³
VI (Similaridade)	4	1	2	1	14	15	7	4	2	7	6	6	4	2	2	1
VII (Caso relatado)	2 ²	1 ⁴	1 ⁶	0	0	0	0	0	2 ¹¹	2 ¹¹	0	0	0	1 ⁴	1 ⁴	1 ⁴
Pontuação	14	10	7	9	22	23	15	11	11	16	11	9	9	11	11	10
Potencial de causar FOs	A	M	B	M	A	A	A	M	M	A	M	M	M	M	M	M

Legenda: FOs – Fissuras orofaciais, A – Potencial alto (Pontuação ≥ 14), Em vermelho validador para potencial alto de causar fissuras orofaciais, M – Potencial médio (Pontuação 8-13), Em amarelo validador para potencial médio de causar fissuras orofaciais, B – Potencial baixo (Pontuação ≤ 7), Em verde validador para potencial baixo de causar fissuras orofaciais,

Vírus e seus identificadores de sequência: RBV – *Rubivirus rubellae* (NC_001545.2), ZIKV – *Zika virus* (NC_035889.1), HHV-1 - *Human alphaherpesvirus 1* (NC_001806.2), DENV-1 – *Dengue virus* - sorotipo 1 (NC_001477.1), DENV-2 - *Dengue virus* - sorotipo 2 (NC_001474.2), DENV-3 - *Dengue virus* - sorotipo 3 (NC_001475.2), DENV-4 – *Dengue virus* - sorotipo 4 (NC_002640.1), YFV – *Yellow fever virus* (NC_002031.1), WNV-1 – *West Nile virus* - linhagem 1 (NC_009942.1), WNV-2 – *West Nile virus* - linhagem 2 (NC_001563.2), JEV – *Japanese encephalitis virus* (NC_001437.1), SLEV – *Saint Louis encephalitis virus* (NC_007580.2), TBEV - *Tick-borne encephalitis virus* (NC_001672.1), ZIKV-PA - *Zika virus* - Paraíba (KU497555.1), ZIKV-CE – *Zika virus* - Ceará (KU527068.1), ZIKV-BE – *Zika virus* - Belém (KU729217.2).

Citações: ¹Hobman, 2013; ²Molnárová et al., 2018; ³Pierson, Lazear, Diamond, 2020; ⁴Guimarães et al., 2019; ⁵Roizman, Knipe, Whitley, 2013; ⁶Avila et al., 2006; ⁷Ribeiro et al., 2017; ⁸Begum et al., 2019; ⁹Da silva et al., 2020; ¹⁰Luo et al., 2018; ¹¹O’leary et al., 2006; ¹²Chaturvedi et al., 1980; ¹³Shen et al., 2014; ¹⁴Divé et al., 2020.

Através da análise dos resultados de similaridade observamos que o *Dengue virus* sorotipo 1 (DENV-1) apresentou um *matche* (*E-value*: 0.070) para uma região inespecífica do cromossomo 6 (GRCh38.p13), *matche* este que também esteve presente na análise do sorotipo 2 (DENV-2) e sorotipo (DENV-3), além do validador *Zika virus*. O DENV-2 também apresentou dentre seus resultados um *matche* com o gene OFCC1 - *Orofacial Cleft candidate 1* alocado no cromossomo 6 (6p24.3), e considerado como um *locus* candidato de fissura orofacial não sindrômica (Davies *et al.*, 2004).

O YFV apresentou médio potencial de causar fissuras orofaciais estando seus resultados de similaridade associados aos seus órgãos de comum tropismo e a genes candidatos relacionados a fissuras orofaciais, exemplificando podemos apresentar à similaridade (*E-value*: 0.002) com o ANKS6 (*ankyrin repeat and sterile alpha motif domain containing 6*).

Quanto a espécie *West Nile virus* podemos observar a diferença nas pontuações obtidas (tabela 1) qual demonstrou para a linhagem 2 (WNV-2) potencial alto de causar FOs seguido da linhagem 1 (WNV-1) apresentando potencial médio. O WNV-2 apresentou sete *matches* com genes candidatos a FOs, como por exemplo o PDSS2 (6q21) qual está relacionado com malformações ortodônticas e craniofaciais (Vieira *et al.*, 2008) e o EPHA7 (6q16.1) EPH Receptor A7 que possui ação na neogênese e apoptose. Os genes EPHA já foram citados anteriormente como possíveis genes candidatos a FOs, tendo como destaque o EPHA1, EPHA3, EPHA2 e EPHA4 (George *et al.*, 1998; Ludwig *et al.*, 2012; Chen *et al.*, 2018).

O *Japanese encephalitis virus*, *Saint Louis encephalitis virus* e o *Tick-borne encephalitis virus* apresentaram potencial médio de causar fissuras orofaciais.

Utilizando sequencias das cepas de *Zika virus* associadas a microcefalia da Paraíba (ZIKV-PA), Ceará (ZIKV-CE) e Belém (ZIKV-BE) (Messias, Silva e Richini-Pereira, 2019) no presente método, podemos observar que o ZIKV-PA e ZIKV-CE demonstraram similaridade (*E-value*: 0.86) com o *Patatin like phospholipase domain containing 1* (PNPLA1), gene que atua no processamento de lipídios (Ohno *et al.*, 2017) e o *PR/SET domain 13* (PRDM13), por sua vez atuante em processos de transição do estado celular e promoção de diversas vias conectadas ao DNA celular (Hohenauer, Moore, 2012). No entanto o ZIKV-BE assim como nosso validador ZIKV teve apenas um *matche* (*E-value*: 0.86) com uma região desconhecida do cromossomo 6. Mesmo com esse diferencial todos permaneceram com potencial médio de causar fissuras orofaciais.

Discussão

O presente estudo buscou estabelecer o potencial dos flavivírus de importância em saúde pública como etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais não sindrômicas. Treze flavivirus foram avaliados, *in silico* e através de um método de pontuação com sete perguntas, divididas em tópicos. Esses tópicos foram respondidos por meio de uma análise integrativa da literatura através das bases de dados SciELO, PubMed, MEDLINE, LILACS e Google Acadêmico afim de ter uma maior quantidade de resultados. Partindo dos *Rubivirus rubellae* (RBV – Vírus da Rubéola), *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1 – Vírus Herpes Simplex 1), *Zika vírus* (ZIKV), pois são vírus que pertencem ao grupo das infecções do acrônimo STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples), grupo este já consolidado na literatura por causarem malformações (inclusive craniofaciais e FOs).

O *Dengue vírus*, é um dos flavivirus mantido globalmente em seu ciclo epidêmico natural pelos artrópodes *Aedes aegypt* (*A. aegypt*) e *Aedes albopictus* (*A. albopictus*). No hospedeiro de sangue quente, no caso o ser humano pode causar a doença Febre Dengue que geralmente é limitada a sintomas como mialgia, artralgia e febre. Quando o infectado desenvolve a forma severa da doença, chamada Febre Hemorrágica da Dengue passa apresentar sintomas hemorrágicos que podem evoluir ao choque hipovolêmico e consequente óbito. O *Dengue vírus* possui quatro sorotipos, sendo o DENV-1 e DENV-3 os mais associados a Febre Dengue, enquanto o DENV-4 e o DENV-2 frequentemente relacionados a forma severa da doença. Esses sorotipos possuem aproximadamente 3% de variância de aminoácidos e 6% de variância nucleotídica, geralmente envolvendo o envelope e a proteína não estrutural 1, todavia o porquê da relação sorotipo e severidade da doença ainda permanece desconhecido (Pierson, Lazear, Diamond, 2020). Dos quatro sorotipos avaliados, três (DENV-2, DENV-3 e DENV-4) possuem potencial alto de causar fissuras orofaciais, enquanto apenas o DENV-1 apresentou potencial médio. Comparando o potencial evidenciado com a doença severa relacionada as cepas (DENV-4 e DENV-2), justificado porque em sua forma severa, por conta da maior resposta inflamatória, há maior dano tecidual (Pierson, Lazear, Diamond, 2020) e considerando sua capacidade transplacentária (RIBEIRO *et al.*, 2017) não seria uma hipótese esdrúxula relacionar essa forma da doença com o aumento do potencial de causar FOs.

O YFV apresentou médio potencial de causar fissuras orofaciais estando seus resultados de similaridade associados aos seus órgãos de comum tropismo e a genes candidatos relacionados as fissuras orofaciais. Considerando a existência de uma vacina eficaz para esse vírus (Pierson, Lazear, Diamond, 2020), cabe a pergunta: se o resultado do potencial de causar

fissuras orofaciais seria diferente, caso a estratégia vacinal fosse inexistente e/ou ineficiente contra essa espécie viral.

O *West Nile vírus*, e suas duas linhagens filogenéticas (WNV-1 e WNV-2) de relevância em saúde pública apresentaram potencial médio e alto respectivamente, o WNV-1 possui disseminação mundial e o WNV-2 se apresenta distribuído na África subsaariana e em Madagascar, onde é menos associado a doenças em humanos e animais não humanos, o que não ocorre na Europa, em que sua presença está associada a fatalidade e doença neurológica severa. Aproximadamente 20% dos infectados desenvolvem a Febre do Oeste do Nilo, que pode variar de sintomas comuns a arboviroses até sintomas poliomielite-like e encefalites (Pierson, Lazear, Diamond, 2020). O’leary e colaboradores (2006) corroboraram com nossos resultados, demonstrando o potencial do WNV em causar FOs pois identificaram um caso de fissura de palato não síndrome associada a infecção congênita por WNV, os autores não identificaram qual foi a linhagem associada a esse caso, mas independente de qual linhagem, claramente o *West Nile virus* é inexplorado nesse contexto.

Com distribuição principal na Ásia e em expansão com casos identificados na África e Austrália, o *Japanese encephalitis vírus* - JEV (Vírus da Encefalite Japonesa) possui ciclo natural mantido principalmente pelo *Culex tritaeniorhynchus* (*C. tritaeniorhynchus*) e aves aquáticas. Assim como no WNV, o papel do ser humano é de “*dead-end host*”, devido a sua baixa carga viral, durante a viremia. A maioria dos casos de infecção são assintomáticos, porém 50% dos casos sintomáticos são fatais ou deixam o paciente com sequelas neurológicas, já que a semiologia pode progredir de sintomas inespecíficos a encefalites (Pierson, Lazear, Diamond, 2020). O JEV possui potencial médio de causar fissuras orofaciais, porém os pesquisadores mais próximos do presente contexto foram Chaturvedi e colaboradores que em 1980 conseguiram isolar o JEV e provar sua passagem transplacentária, todavia eles não conseguiram testar as crianças quanto a presença do JEV, justificado em parte por quase metade de sua amostra resultar em abortos, porém propõem que se o agente viral consegue passar pela barreira hematoencefálica e também poderia passar pela placenta. Portanto é evidente a necessidade de mais estudos no presente contexto, uma vez que décadas separam o trabalho de Chaturvedi et al., (1980) até o momento.

Muito similar ao JEV e WNV, o *Saint Louis encephalitis virus* (Vírus da Encefalite de Saint Louis) também é transmitido dentro do ciclo *Culex* e aves. Apesar de ser mais identificado nos Estados Unidos, sua distribuição já foi evidenciada na América Central e América do Sul, em maior parte sua infecção ocorre de forma assintomática, todavia também como o WNV e JEV, o SLEV está associado a doença neurológica com mortalidade de 5-20% (Pierson, Lazear,

Diamond, 2020). Assim como o TBEV as investigações no contexto do presente trabalho são escassas ou inexistentes porém é imprudente descartar seu potencial, uma vez que seis *matches* significantes se apresentaram com sequencias relacionadas as fissuras orofaciais, como por exemplo o *matche* com o *E-value* de 0.87 com uma região do fator transcricional *T-box transcription factor 18* (TBX18), este por sua vez essencial para o processo de desenvolvimento das células embrionárias (Gorabi *et al.*, 2019).

Diferente dos outros flavivírus apresentados o *Tick-borne encephalitis virus* (Vírus da Encefalite do Carrapato) é mantido em seu ciclo biológico pelo carrapato *Ixodes ricinus* (*I. ricinus*) e *Ixodes persulcatus* (*I. persulcatus*). O ser humano pode ser o hospedeiro acidental por conta da alimentação do carrapato infectado. Um terço dos infectados desenvolvem sintomas similares aos do WNV, JEV e SLEV com mortalidade que pode chegar a 40%. Por hora, endêmica na Ásia e Europa, a Encefalite do Carrapato assim como as outras doenças explanadas anteriormente expandem sua disseminação por conta do desequilíbrio ambiental (Pierson, Lazear, Diamond, 2020). No contexto desse trabalho o TBEV possui potencial médio de causar fissuras orofaciais, poderíamos desconsidera-lo pela inabilidade de passagem transplacentária apresentado pelo relato de caso de Divé *et al.*, (2020), porém acreditamos não ser prudente descartar seu potencial.

Dentre os flavivírus de importância em saúde pública, as análises demonstraram que o *Dengue virus* e o *West Nile virus* possuem potenciais altos de causar fissuras orofaciais. Contrário do que era esperado empiricamente para com o *Zika virus*, que atualmente é estimado como o flavivirus que causa malformação congênita, qual apresentou potencial médio em todas as cepas selecionadas, bem como o *Japanese encephalitis virus*, *Tick-borne encephalitis virus*, *Saint Louis encephalitis virus* e *Yellow fever virus*.

Como limitação os dados apresentados nesse estudo devem ser interpretados com cautela, pois foi utilizado apenas sequencias referenciais em relação aos vírus e utilizado apenas um banco de dados de sequencias humanas. Quanto ao levantamento de literatura podemos ressaltar a escassez de investigações no contexto, assim prejudicando alguns tópicos do score e também evidenciando a negligência por não haver pesquisas na área.

Conclusão

Portanto, buscando evidências para incentivar prevenção sugerimos o potencial alto de causar fissuras orofaciais nas espécies *Dengue virus* e *West Nile virus*. Ressaltando a necessidade da proteção contra artrópodes hematófagos com o uso de repelentes, telas em

janelas, eliminação de criadouros, evitar dormir com seu animal de estimação (para o caso de contato com carrapatos), uso de coleiras antipulgas e carrapatos nos pets e se atentar quanto a viagens para lugares com surtos endêmicos, principalmente se for gestante. No contexto hospitalar, os profissionais da saúde que atendem gestantes não devem negligenciar esses vírus, sobretudo no contexto de malformações, quanto mais se especificarmos para as fissuras orofaciais. E claro, ressaltamos a necessidade de outros tipos de estudo (*in vitro* e *in vivo*) para melhor entender essas possibilidades e desenvolver melhores estratégias de controle.

Referências

- Amaral VLAR. Aspectos psicológicos, problemas sociais e familiares associados às fissuras lábio palatinas. In: Carreirão S, et al. Tratamento das fissuras labiopalatinas. Rio de Janeiro: Revinter; 1996:19-23.
- Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research*. 1997;25(17):3389–3402.
- Avila JR. et al. PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *American Journal of Medical Genetics Part A*. 2006;140(23):2562-2570.
- Begum F, Das S, Mukherjee D, Mal S, Ray U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. *Viruses*. 2019;11(12):1136.
- Chan RK, Mcpherson B, Whitehill TL. Chinese attitudes toward cleft lip and palate: effects or personal contact. *Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2006;43:731-9.
- Chaturvedi UC, Mathur A, Chandra A, Das SK, Tandon HO, Singh UK. Transplacental infection with Japanese encephalitis virus. *Journal Infections Diseases*. 1980;141(6):712-5.
- Chen R, Guo S, Wang X, Mu Y, Duan E, Xu Y. Association of EPHA3 Gene Polymorphisms with Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Genet Test Mol Biomarkers*. 2018;22(7):420-424.

da Silva FC, Magaldi FM, Sato HK, Bevilacqua E. Yellow Fever Vaccination in a Mouse Model Is Associated With Uninterrupted Pregnancies and Viable Neonates Except When Administered at Implantation Period. *Front Microbiol.* 2020;11:245.

Davies SJ, Wise C, Venkatesh B, MIRZA, G.; Jefferson A.; Volpi EV, Ragoussis J. Mapping of three translocation breakpoints associated with orofacial clefting within 6p24 and identification of new transcripts within the region. *Cytogenet. Genome Res.* 2004;105:47-53.

Divé I, Veje M, Dobler G, et al. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in pregnancy: Absence of virus transmission to the fetuses despite severe maternal disease - A case study. *Ticks Tick Borne Dis.* 2020;11(5):101491.

George SE, Simokat K, Hardin J, Chisholm AD. The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans*. *Cell.* 1998;92(5):633–643.

Gorabi AM, Hajighasemi S, Tafti HA, et al. TBX18 transcription factor overexpression in human-induced pluripotent stem cells increases their differentiation into pacemaker-like cells. *J Cell Physiol.* 2019;234:1534–1546.

Gubler DJ. Human Arbovirus Infections Worldwide. *Annals of the New York Academy of Sciences.* 2001;951(1):13-24.

Guimarães GMMF, Oliveira IAS, Sousa PS, Doriqui MJR, Fiamoncini ES, Ferreira Júnior O, Consolaro A. Cleft Lip and palate in babies with microcephaly by zika virus: would there be an etiopathogenic relationship?. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.* 2019;48(1):21.

Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D, McKusick VA. Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Human mutation*, v. 15, n. 1, p. 57–61, 2000. <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G)>.

Hatcher EL, Zhdanov SA, Bao Y, Blinkova O, Nawrocki EP, Ostapchuck Y, Schäffer AA, Brister JR. Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic acids research.* 2017;45(D1):D482–D490.

Hobman TC. Rubella Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013:687-711.

Hohenauer T, Moore AW. The Prdm family: expanding roles in stem cells and development. *Development* 1 July 2012;139(13):2267–2282.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Information: newsletters. Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, 2021a. Available at: <https://talk.ictvonline.org/information/newsletters/w/newsletters>. Accessed January 04, 2021.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). Taxonomy. Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, 2021b. Available at: <https://talk.ictvonline.org/information/newsletters/w/newsletters>. Accessed January 04, 2021.

Lobo FP, Mota BE, Pena SD, Azevedo V, Macedo AM, Tauch A, Machado CR, Franco GR. Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. *PloS one*. 2009;4(7):e6282.

Loffredo LCM, Souza JMP, Yunes J, Freitas JAS, Spiri WC. Fissuras lábio-palatais: estudo caso-controle. *Revista de Saúde Pública*. 1994;28(3):213-217.

Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG. Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994. *Revista de Saúde Pública*. 2001;35(6):571-575.

Ludwig KU, Mangold E, Herms S, Nowak S, Reutter H, Paul A, Becker J, Herberz R, Alchawa T, Nasser E, Böhmer AC, Mattheisen M, Alblas MA, Barth S, Kluck N, Lauster C, Braumann B, Reich RH, Hemprich A, Pötzsch S, et. al. Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci. *Nature genetics*. 2012;44(9):968–971.

Luo H, Winkelmann ER, Fernandez-Salas I, Li L, Mayer SV, Danis-Lozano R, Sanchez-Casas RM, Vasilakis N, Tesh R, Barrett AD, Weaver SC, Wang T. Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential anti-viral immune responses in human monocytic and first trimester trophoblast cells. *Antiviral research*. 2018;151:55–62.

Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR. Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. *Nature medicine*. 2004;10(12):98–109.

Messias TS, Silva KCP, RICHINI-PEREIRA VB. Presença de Mutações em cepas de Zika virus associadas a microcefalia: Uma análise in silico. In: DALAZOANA, K. *Fundamentos e Aplicações da Biologia*. Atena Editora, 2019;172-176,

Molnarova A, Petrovicova A, Fedeles J, Bopegamage S, Horakova E. Coxsackie viral infection and orofacial cleft. *Bratislavske lekarske listy*. 2002;103(10):365–367.

Molnarova A, Palencar D, Fekiacova D, et al. Orofacial clefts and infections during pregnancy. *Biologia*. 2018;73(6):629–635.

Monlleo IL, Gil-da-Silva-Lopes VL. Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. *Cadernos de Saúde Pública*. 2006;22(5):913-922.

Moore CG, Mclean RG, Mitchell CJ, Nasci RS, Tsai TF, Calisher CH, et al. Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. Fort Collins, CO: Centers for Disease Control and Prevention. 1993;500:36-40.

Nazer J, Hubner ME, Catalan J, Cifuentes L. Incidência de lábio leporino y paladar hendido en la Maternidad Del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y en las maternidades chilenas participantes en el Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congênicas (ECLAMC). *Rev. méd. Chile, Santiago*. 2001;129(3):285-293.

Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF. Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênicas lábio-palatais na população escolar de Bauru. *Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo*. 1968;6(2):111-128.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Basic Local Alignment Search Tool, Version 2.5.0 [Software]. 2018a. Available at: <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>. Accessed February 26, 2018.

National Center for Biotechnology Information (NCBI). Bethesda. 2018b. Available at: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>. Accessed February 26, 2018.

Novella IS, Clarke DK, Quer J, Duarte EA, Lee CH, Weaver SC, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ. Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *Journal of virology*. 1995;69(11):6805–6809.

Ohno Y, Kamiyama N, Nakamichi S, Kihara A. PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω -O-acylceramide. *Nature communications*. 2017;8:14610.

O'Leary DR, Kuhn S, Kniss KL, Hinckley AF, Rasmussen AS, Pape WJ, Kightlinger LK, Beecham BD, Miller TK, Neitzel DF, Michaels SR, Campbell GL, Lanciotti RS, Hayes EB. Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004. *Pediatrics*. 2006;117(3):537-545.

Owens JR, Jones JW, Harris F. Epidemiology of facial clefting. *Archives of disease in childhood*. 1985;60(6):521–524.

Pierson TC, Diamond MS. Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2013:747-794.

Pierson TC, Lazear HM, Diamond MS. Flaviviruses: Dengue, Zika, West Nile, Yellow Fever and Other Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. *Fields virology*. 7th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2020:345-409.

Rather IA, Kumar S, Bajpai VK, Lim J and Park Y-H (2017) Prevention and Control Strategies to Counter ZIKA Epidemic. *Front. Microbiol.* 8:305

Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects-- Reviewing the Evidence for Causality. *The New England journal of medicine*. 2016;374(20):1981–1987.

Ribeiro CF, Lopes V, Brasil P, Pires A, Rohloff R, Nogueira R. Dengue infection in pregnancy and its impact on the placenta. *International journal of infectious diseases (IJID): official publication of the International Society for Infectious Diseases*. 2017;55:109–112.

Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology. two: Wolters Kluwer Health* 2013. p. 2456.

Shen SC, Shen CI, Lin H, Chen CJ, Chang CY, Chen SM, et al. Susceptibility of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Cells to Japanese Encephalitis Virus Infection. *PLoS ONE*. 2014;9(12):e114990.

Silva Filho OG, Freitas JAS. Caracterização Morfológica e Origem Embriológica. In: Trindade IEK, Silva Filho OG. *Fissuras Labiopalatinas: Uma Abordagem Interdisciplinar*. São Paulo: Santos Editora; 2007:17-49.

Souza JMP, Buchalla CM, Laurenti R. Estudo da morbidade e da mortalidade perinatal em maternidades: III - Anomalias congênitas em nascidos vivos. *Revista de Saúde Pública*. 1987;21(1):5-12.

Sousa MAC, Paraná R, Andrade LJO. SEQUENCE SIMILARITY BETWEEN THYROID SELF-PROTEIN AND HEPATITIS C VIRUS POLYPROTEIN: possible triggering mechanism of autoimmune thyroiditis. *Arquivos de Gastroenterologia*. 2016;53(3):185-191.

Souza MT, Silva MD, Carvalho R. Revisão integrativa: o que é e como fazer. *Einstein (São Paulo)*. 2010;8(1):102-106.

Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D. The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current protocols in bioinformatics*. 2016;54:1.30.1–1.30.33.

Vieira AR, Mchenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML. Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts.

Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics. 2008;10(9):668–674.

Villordo SM, Carballeda JM, Filomatori CV, Gamarnik AV. RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. Trends in microbiology. 2016;24(4):270–283.

World Health Organization (WHO). Arboviruses and human disease: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 26 September to 1 October 1966]. World Health Organization technical report series. 1967;369:84.

World Health Organization (WHO). Zika virus. Available at: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. 2016. Accessed June 10, 2018.

4.2 Artigo 2

Artigo de Pesquisa configurado de acordo com as normas do *Brazilian Journal of Microbiology*

Investigação de flavivírus emergentes no Brasil como etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais não sindrômicas

Resumo

O Brasil é um dos países com maior área florestal do planeta e com potencial de emergência de novas doenças. Por sua vez as fissuras orofaciais são caracterizadas como malformações congênitas, podendo estar associadas a genética e a fatores ambientais. Como um dos fatores ambientais relacionado as malformações congênitas são os vírus, nosso objetivo foi investigar o potencial dos flavivírus emergentes no Brasil como etiologia de fissuras orofaciais. Foi criado para a análise um método de pontuação com sete tópicos baseado em literatura e análise de similaridade nucleotídica, utilizando para obter os genomas virais o *NCBI virus* e para as análises de similaridade o *BLAST 2.12.0*. O flavivírus emergente no Brasil que apresentou potencial alto de causar fissuras orofaciais foi a cepa Iguape vírus (espécie *Aroa virus*), seguido pela espécie *Cacipacore virus* e a cepa Rocio vírus (espécie *Ilheus virus*) com potencial médio de causar fissuras orofaciais. Como prevenção é indicado o controle de artrópodes e a difusão hospitalar sobre dinâmica viral, principalmente dos flavivírus, para que estes não sejam mais um ponto negligenciado em saúde pública, principalmente no contexto de fissuras orofaciais e outras malformações congênitas.

Palavras-chave: Fenda labial, Fissura palatina, Flavivirus, Etiologia, Fissuras Orofaciais.

Introdução

Com 8.510.345,538 Km², o Brasil é o maior país da América do Sul e possui uma população humana de aproximadamente 213 milhões de habitantes. Dentro de sua fitoecologia, 26,21% de seu território é composto de floresta ombrófila densa possuindo em menor distribuição diversos outros habitats como floresta ombrófila aberta (11,94%), floresta estacional semidecidual (6,14%), savana-estépica (6,76%), dentre outros ¹. Dados levantados

pelo Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE) entre os anos 2000 e 2018 apontam um desmatamento de aproximadamente 500 mil Km², sendo o dano maior na Floresta Amazônia¹.

O desequilíbrio ambiental é um dos fatores principais para emergência e reemergência de vírus, principalmente arboviroses^{3,4}. Esses agentes se multiplicam nos hospedeiros e nos artrópodes hematófagos e são transmitidos para novos vertebrados susceptíveis através da picada do vetor infectado, recomeçando assim o ciclo epidemiológico^{5,6}. Dentro do gênero *Flavivirus* estão algumas das arboviroses de maior importância para saúde pública, como *Dengue virus* (DENV – Vírus da Dengue) e o *Yellow fever virus* (YFV – Vírus da Febre Amarela)⁷. Os membros do gênero *Flavivirus* são distribuídos por todo globo e são agentes etiológicos de diversas epidemias de difícil controle, por conta de suas características epidemiológicas dinâmicas⁸. Apresentando diversas variáveis patológicas os flavivírus podem partir de sintomas inespecíficos a encefalites e febres hemorrágicas, tendo até integrantes associados a malformações congênitas como no caso do *Zika virus* (ZIKV – Vírus Zika)⁹.

As malformações congênitas afetam 5% dos nascidos vivos e compõe um dos problemas em saúde pública mundiais, das quais as alterações craniofaciais e em especial as fissuras orofaciais (FOs) compõem um grupo de destaque acometendo de 0,2 a 0,9% a cada 1000 nascidos vivos^{10,11,12,13}. Essas anomalias resultam de alterações morfológicas durante o desenvolvimento embrionário humano, ocorridas no início da vida intrauterina. Possuem uma etiologia complexa e multifatorial com grande destaque ao fator ambiental e podem ser caracterizadas em anomalias isoladas e múltiplas, de etiologia genética associada a síndromes ou não¹⁴. As FOs geram significativo impacto sobre a vida dos indivíduos, afetando funções básicas como respiração, alimentação, fala e aparência¹⁵, principalmente devido à estigmatização e exclusão social que interferem no seu desenvolvimento psicossocial¹⁶. A formação de FOs ocorre durante os primeiros três meses de gestação (até a 12ª semana de vida intrauterina)¹⁷, período durante o qual quaisquer alterações no processo embrionário natural, como infecções virais, uso de compostos teratogênicos, ou exposição à radiação excessiva pode causar danos anatômicos. A etiologia dos FOs é definida como a ausência de fusão tecidual, ou seja, alteração dos processos celulares de diferenciação, proliferação e migração celular^{18,19}.

Por se tratar de uma entidade clínica de etiologia multifatorial as FOs possuem lacunas que ainda não estão definidas sobre a possibilidade e o potencial dos flavivírus atuarem como agentes teratogênicos dessas alterações, somando o pouco que sabemos sobre os flavivírus emergentes no território brasileiro. É plausível considerar a importância dessas infecções virais para o estudo etiológico de FOs, portanto o objetivo desta pesquisa foi investigar por meio de

similaridade nucleotídica (Vírus e Hospedeiro) e literatura o possível potencial desses vírus de causarem FOs.

Material e Métodos

Para analisar a possibilidade de um flavivírus causar fissuras orofaciais, foi desenvolvido um método de pontuação contendo sete questões: I – O vírus causa doença? Se sim o vírus ganha a pontuação 1 (foi considerado positivo somente os vírus que causam sintomas em 30% dos infectados ou mais), se negativo 0; II – A infecção é transplacentária? Se negativo o vírus ganha pontuação 0, caso positivo o vírus ganha a pontuação 2, caso a passagem transplacentar nunca foi investigada para o vírus ele ganha a pontuação 1; III – Durante o ciclo biológico viral ocorre viremia? (ciclos biológicos clássicos), se positivo a pontuação é 1, se negativo a pontuação atribuída é 0; IV – Possui tropismo por células da face e/ou progenitoras? Se positivo é concedido pontuação 2, se negativo pontuação 0 e caso não tenha sido investigado pontuação 1; V – Durante a replicação viral ocorre dano celular? (intra e/ou extra celular) (Com base na biossíntese viral, o dano celular foi considerado tanto pela presença de lise, como por rearranjo de organelas, supressão proteica, alteração do meio extracelular e alterações estruturais irreversíveis). Se não ocorre dano o vírus terá a pontuação 0, se houver dano intra celular ganhará +1, se houver dano extra celular ganhará +1. VI – O vírus possui similaridade nucleotídica com sequências humanas associadas a fissuras orofaciais? (Para análise de similaridade foi utilizado o software *BLAST 2.12.0*). Em cada *match* o vírus ganha +1, para cada resultado duplicado foi aplicado -1; VII – Existe caso relatado em literatura associando-o a fissuras orofaciais? Caso negativo a pontuação é 0, se a associação ocorrer somente pela clínica a pontuação é 1, em caso de confirmação por exames laboratoriais que detectam antígeno e/ou anticorpo relacionado ao vírus a pontuação atribuída é 2, para confirmação através de reação da cadeia de polimerase e/ou cultivo viral a pontuação atribuída é 3.

Para responder as questões I, II, III, IV, V e VII foi realizado uma análise integrativa da literatura através das bases de dados PubMed, MEDLINE, SciELO, LILACS e Google Acadêmico afim de ter uma maior quantidade de resultados. Para a questão VI foi utilizado o software *Basic Local Alignment Search Tool – BLAST 2.12.0*²⁰. Para a busca de similaridade com sequências humanas associadas a fissuras orofaciais foi selecionado o banco de dados *Genomic + transcript databases (Human genomic plus transcript human G+T)*. As sequências virais utilizadas foram obtidas no *National Center for Biotechnology Information Virus - NCBI Virus*²¹, no qual foram selecionados apenas genomas completos e referenciais. Por conta da divergência de registros genéticos das FOs dentro da NCBI e afim de ter uma análise mais

fidedigna foi utilizado três *Entrez query* como filtro de sequências humanas “*Orofacial cleft*”, “*Cleft lip*” e “*Cleft palate*”. Os programas *megablast*, *discontiguous megablast* e *blastn* foram rodados com o limiar estatístico *E-value* ajustado para considerar apenas resultados ≤ 1 .

A verificação de função dos genes e transcritos observados no resultado de similaridade foi realizada através do catálogo online de genes humanos e doenças genéticas *OMIN*[®] (*Online Mendelian Inheritance in Man*)²² e a base de dados genéticos do *GeneCards*[®]: *The Human Gene Database*²³.

Para validação do método de pontuação de avaliação do potencial de causar FOs foram selecionadas as espécies *Rubivirus rubellae* (RBV – Vírus da Rubéola), *Human alphaherpesvirus 1* (HHV-1 – Vírus Herpes Simplex 1) e *Zika virus* (ZIKV). Os vírus selecionados constituíram este controle por pertencerem ao grupo das infecções do acrônimo STORCH (Sífilis, Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples), grupo este já consolidado na literatura por causarem malformações (inclusive craniofaciais e FOs) e no caso do *Zika virus* por ser um dos principais flavivírus com relação a doença congênita confirmado através dos casos de síndrome congênita do ZIKV (qual a manifestação clínica predominante é a microcefalia)^{7,24}.

Resultados

Apresentamos na Tabela 1 os resultados de potencial dos flavivírus emergentes no Brasil atuarem como etiologia de fator ambiental em fissuras orofaciais.

Tabela 1. O potencial dos flavivírus emergentes no Brasil de causar fissuras orofaciais, 2021.

TÓPICO/VÍRUS	RBV	ZIKV	HHV-1	BSQ V	IGU V	CPC V	ILHV	ROCV
I (Doença)	1 ²⁵	1 ⁹	0 ²⁸	0 ³⁰	0 ³¹	0 ³⁰	0 ³²	0 ³
II (Transplacentar)	2 ²⁵	2 ⁹	2 ²⁸	1	1	1	1	1
III (Viremia)	1 ²⁵	1 ⁹	0 ²⁸	1 ⁹	1 ⁹	1 ⁹	1 ⁹	1 ⁹
IV (Tropismo)	2 ²⁵	2 ⁹	2 ²⁸	1	1	1	1	1
V (Dano celular)	2 ²⁵	2 ⁹	0 ²⁸	0	0	0	0	0
VI (Similaridade)	4	1	2	0	18	5	4	7
VII (Caso relatado)	2 ²⁶	1 ²⁷	1 ²⁹	0	0	0	0	0
Pontuação	14	10	7	3	21	8	7	10

Potencial de causar FOs	A	M	B	B	A	M	B	M
-------------------------	---	---	---	---	---	---	---	---

Legenda: FOs – Fissuras orofaciais, A – Potencial alto (Pontuação ≥ 14), Em vermelho validador para potencial alto de causar fissuras orofaciais, M – Potencial médio (Pontuação 8-13), Em amarelo validador para potencial médio de causar fissuras orofaciais, B – Potencial baixo (Pontuação ≤ 7), Em verde validador para potencial baixo de causar fissuras orofaciais,

Vírus e seus identificadores de sequência: RBV – *Rubivirus rubellae* (NC_001545.2), ZIKV – *Zika virus* (NC_035889.1), HHV-1 - *Human alphaherpesvirus 1* (NC_001806.2), BSQV – *Aroa virus – Bussuquara vírus* (AY632536.4), IGUV – *Aroa virus – Iguape vírus* (AY632538.4), CPCV – *Cacipacore virus* (NC_026623.1), ILHV – *Ilheus virus* (KC481679.1), ROCV – *Ilheus virus – Rocio vírus* (NC_040776.1).

O validador RBV (Vírus da Rubéola), membro do gênero *Rubivirus* apresentou pontuação 14 (em vermelho), e foi definido como limiar para o potencial alto de causar fissuras orofaciais. Como limiar médio foi definido o ZIKV com a pontuação 10 (em amarelo). Em verde apresentamos o validador HHV-1 com pontuação 7 e portanto considerado baixo potencial de causar fissuras orofaciais.

Foi evidenciado um significativo contraste entre cepas de uma mesma espécie, o Bussuquara vírus apresentando potencial baixo de causar fissuras orofaciais, não havendo nenhum *matche* com significância estatística, contrário do que foi observado no Iguape vírus que teve 18 *matches* e portanto considerado como potencial alto de causar FOs.

Quanto a espécie *Cacipacore virus* (CPCV) foi observado potencial médio para causar FOs demonstrando cinco *matches* com genes do cromossomo 6 (GRCh38.p13).

O Rocio vírus apresentou um perfil de potencial médio com seis *matches* para genes do cromossomo 6 (GRCh. 38.p13) e um *matche* para o gene MASP1 (3q27.3), enquanto o Ilheus vírus demonstrou potencial baixo apresentando *matche* com quatro genes do cromossomo 6 (GRCh. 38.p13).

Discussão

O presente estudo investigou similaridade nucleotídica a nível genoma e transcriptoma e isso por mais que nos limite quanto a fenótipos, nos possibilita investigar a base nucleotídica da coevolução vírus-hospedeiro, já que os vírus não utilizam apenas proteínas para se adaptar ao hospedeiro, pelo contrário, RNAs virais podem não só controlar a população viral intracelular para não levar a célula a exaustão antes da hora, como também modular a resposta antiviral da célula infectada³⁶. A busca por similaridades entre sequências por dados de bioinformática pode gerar evidências preliminares, dependendo da hipótese, como por exemplo no estudo de processos de coevolução, a relação vírus-hospedeiro representa bem este

propósito, considerando que são parasitas intracelulares obrigatórios sofrendo pressões seletivas a todo instante no hospedeiro com o inverso ocorrendo da mesma forma ³⁷, o que também foi demonstrado para os flavivírus ³⁸. Acreditamos que um dado isolado de similaridade, homologia ou predição é de pouca valia quando o objetivo não é identificar espécies semelhantes ou predizer a função de um novo gene comparando-o com um similar. Porém quando se trata dos vírus, que são relacionados evolutivamente com seus hospedeiros, e acrescido de outros pontos contextuais (Tabela 1), com base em literatura, podemos explorar o potencial dos flavivírus emergentes no Brasil como etiologia de fator ambiental de fissuras orofaciais. Também é necessário acrescentar que por ser tratar de uma doença complexa, os vírus tão presentes em nossa sociedade podem ser considerados negligenciados como possível causa, em vista das poucas investigações a respeito.

A emergência e reemergência de doenças é ocasionada por diversos fatores sequenciais ou simultâneos, como o crescimento desordenado da espécie hospedeira e atividades humanas que principalmente afetam o equilíbrio do ecossistema. E por conta da globalização uma doença emergente e/ou reemergente deve ser considerada como potencial problema de saúde pública independente se por hora está mantida em situação endêmica ³³. O Brasil apresenta diversas doenças infecciosas de relevância em saúde pública, Souza e colaboradores (2020)³⁴ levantaram indicadores relacionados as doenças Febre Dengue, Malária, Chagas, Leishmaniose, Tuberculose, Hepatite A e evidenciaram situação crítica em diversas regiões do país, sobretudo nas regiões norte, nordeste e centro-oeste, sugerindo como indicador protetivo ou minimizante “esgoto adequado”. Somando o desequilíbrio ambiental nacional em que por análises de 2000 a 2018 realizadas pelo IBGE (2020) ² revelaram que aproximadamente 500.000 km² de área natural foram perdidas, sendo que o dano principal ocorreu na Amazônia (269.801 km²) e no Cerrado (152.706 km²). E em vista dos problemas de infraestrutura básica é inegável o potencial do Brasil na emergência e reemergência de doenças infecciosas. Como descrito por Souza et al., (2020)³⁴ o DENV é um dos principais agentes infecciosos circulantes no país, membro do gênero *Flavivirus*, ele compartilha ancestralidade com mais cinquenta e duas espécies conhecidas e inúmeras cepas e variantes ³⁵. Os flavivírus possuem diversas manifestações clínicas, e ainda existe muito a se investigar, sobre patologia, epidemiologia, seu relacionamento com os vetores biológicos e seus hospedeiros, isso considerando aqueles que mais conhecemos, como por exemplo o DENV, ZIKV e o YFV ⁹. Dentro do contexto de fator ambiental em FOs mal sabemos o potencial dos flavivírus já estudados, quanto mais os emergentes provenientes de um dos países com a maior área florestal do planeta ².

O validador RBV (Vírus da Rubéola), membro do gênero *Rubivirus* foi definido como limiar para o potencial alto de causar fissuras orofaciais. Não é surpresa o RBV apresentar esse potencial, em vista que o mesmo é um dos mais antigos agentes associados a anomalias congênitas²⁵. Como limiar médio foi definido o ZIKV, sendo um dos membros do gênero *Flavivirus*, o ZIKV geralmente causa a arbovirose Febre Zika, porém foi associado ao aumento de casos de microcefalia no nordeste brasileiro em 2015 e apresenta significativo tropismo por células progenitoras⁹, com sua patologia dinâmica e um potencial teratogênico ainda não explorado em sua totalidade. O validador HHV-1 foi considerado baixo potencial de causar fissuras orofaciais. Como membro do gênero *Simplexvirus*, o HHV-1 (Herpes Simplex vírus 1) é distribuído por todo globo e permanece no hospedeiro até sua morte, sua patologia está associada principalmente ao estado imunológico do infectado, podendo causar infecção *in utero* via transplacentária e/ou ascendente²⁸.

O Bussuquara vírus (BSQV) e o Iguape vírus (IGUV) são cepas da espécie *Aroa virus* dentro do grupo de transmissão via mosquito⁷. Quanto ao BSQV associado a doença, houve apenas um caso identificado com dor em articulações, anorexia e cefaleia. Já a cepa IGUV não há casos de doenças conhecidas³¹. Dentre os resultados apresentados pelo IGUV destaca-se os *matches* para o gene ZNF462 (9q31.2)³⁹ e o gene N4BP2 (4p14)⁴⁰ ambos associados comumente a anomalias dentárias congênitas e considerados genes candidatos de fissuras orofaciais não sindrômicas. Investigações filogenéticas de poliproteína desenvolvidas por Pierson, Lazear e Diamond (2020) indicam que o BSQV e IGUV fazem parte do agrupamento vetorial *Culex* compartilhando a categoria com flavivírus de importância em saúde pública como o *West Nile virus* e o *Japanese encephalitis virus*⁹.

A espécie *Cacipacore virus* (CPCV) não possui doença humana associada³¹. Porém em taxonomia o *International Committee on Taxonomy of Viruses* (2021) decidiu inseri-lo dentro do grupo de transmissão por mosquito próximo da espécie *Japanese encephalitis virus*. O CPCV apresentou cinco *matches* com genes do cromossomo 6 (GRCh38.p13), genes responsáveis por transferência intracelular de ácidos graxos (*FABP7 - Fatty Acid-Binding Protein 7*) e transcrição do material genético intracelular (*TFB1M - Transcription Factor B1, Mitochondrial*) ou seja atua na multiplicação celular e diferenciação celular⁴¹, os quais podem gerar danos, se alterados na embriogênese.

O ILHV e o ROCV são cepas da espécie *Ilheus virus* no grupo de flavivírus de transmissão por mosquito com base na espécie *Ntaya virus*, compartilhando espaço com o *Zika virus*⁷. O ILHV foi isolado de mosquitos do gênero *Aedes* e *Psorophora* no estado da Bahia, durante uma investigação de *Yellow fever virus*⁴². Figueiredo (2007) discorre sobre a possível

distribuição do ROCV por todo país e o define como uma ameaça permanente. Sobre o potencial dessas cepas em causar fissuras orofaciais, o ROCV apresentou um perfil médio com seis *matches* para genes do cromossomo 6 (GRCh. 38.p13) e um *matche* para o gene MASP1 (3q27.3) cujas funções na via da lectina do sistema complemento, desempenham um papel fundamental na imunidade inata e atualmente as mutações neste gene vem sendo relacionado a diversas síndromes e alterações anatômicas não sindrômicas ²³, enquanto o ILHV demonstrou *matche* com quatro genes do cromossomo 6 (GRCh. 38.p13) responsáveis por diversos mecanismos de sinalização celular e manutenção do ciclo celular, sendo este último também evidenciado no CPCV e de maior relevância no causal das FOs ⁴¹.

Corroborando com a alta variabilidade viral ⁴³ nossos resultados demonstraram contrastes dentro de espécies, isso serve de ressalva, principalmente para as políticas de saúde pública, que não são microrganismos que devem ser negligenciados. Também podemos apontar os poucos dados existentes sobre essas viroses emergentes no Brasil, mesmo que ainda tenhamos muito a conhecer sobre flavivírus de importância em saúde pública como *Dengue virus* e *Zika virus*, as espécies *Ilheus virus*, *Cacipacore virus* e *Aroa virus* carecem urgentemente de recentes investigações. Quanto ao cabível do presente trabalho evidenciamos o alto potencial de causar fissuras orofaciais na cepa Iguape vírus que apresentou mais *matches* de similaridade do que o próprio validador de potencial alto *Rubivirus rubellae*.

Como limitação, os dados fornecidos neste estudo devem ser interpretados com cautela, pois foram utilizadas apenas sequências virais referenciais, ou seja aquela que representa a espécie e apenas um banco de dados de sequências humanas. Em relação ao levantamento da literatura, podemos destacar a escassez de pesquisas que prejudicam alguns tópicos da pontuação, demonstrando a necessidade de mais pesquisas na área.

Portanto é prudente o incentivo financeiro e intelectual em pesquisas sobre vírus emergentes e suas possíveis associações. As fissuras orofaciais são doenças complexas, dependente de inúmeros fatores, dentre eles o período e a duração de exposição do feto a fatores ambientais. Dentre esses fatores ambientais os vírus são os mais dinâmicos e imprevisíveis, todavia carecem de pesquisas. Portanto buscando evidências para incentivar prevenção sugerimos dentro dos flavivírus de emergência no Brasil o potencial alto de causar fissuras orofaciais na cepa Iguape vírus. Também generalizando os cuidados para com todos os flavivírus transmitidos por artrópodes é indicado o uso de repelentes, telas em janelas, eliminação de criadouros, evitar dormir com seu animal de estimação (para o caso de contato com carrapatos), uso de coleiras antipulgas e carrapatos nos pets e se atentar quanto a viagens para lugares com surtos endêmicos, principalmente se for gestante. No contexto hospitalar os

profissionais da saúde que atendem gestantes não devem negligenciar esses vírus, sobretudo no contexto de malformações, quanto mais se especificarmos para as fissuras orofaciais. E claro, ressaltamos a necessidade de outros tipos de estudo (*in vitro* e *in vivo*) para melhor entender essas possibilidades e desenvolver melhores estratégias de controle.

Referências

1. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística - IBGE (2021) Pesquisa por cobertura vegetal e outras áreas. BDIA - Banco de Dados de Informações Ambientais. <https://bdiaweb.ibge.gov.br/#/consulta/vegetacao>. Accessed 04 January 2021.
2. Pierson TC, Diamond MS (2013) Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) Fields virology, 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 747-794.
3. Figueiredo LTM (2007) Arboviroses emergentes no Brasil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical. 40 (2): 224-229, ISSN 1678-9849. <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>>.
4. Gubler DJ (2001) Human Arbovirus Infections Worldwide. Annals of the New York Academy of Sciences 951(1):13-24. <https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>.
5. World Health Organization – WHO (1967) Arboviruses and human disease: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 26 September to 1 October 1966]. World Health Organization technical report series 369:84.
6. Moore CG, Mclean RG, Mitchell CJ, Nasci RS, Tsai TF, Calisher CH et al (1993) Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States. Fort Collins, CO: Centers for Disease Control and Prevention 500:36-40.
7. International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV (2021a) Information: newsletters. Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham. <https://talk.ictvonline.org/information/newsletters/w/newsletters>. Accessed 04 January 2021.
8. Mackenzie JS, Gubler DJ, Petersen LR (2004) Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. Nature medicine 10(12):98–109. <https://doi.org/10.1038/nm1144>.

-
9. Pierson TC, Lazear HM, Diamond MS (2020) Flaviviruses: Dengue, Zika, West Nile, Yellow Fever and Other Flaviviruses. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, 7th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 345-409.
10. Nagem Filho H, Moraes N, Rocha RGF (1968) Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas lábio-palatais na população escolar de Bauru. *Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo* 6(2):111-128.
11. Souza JMP, Buchalla CM, Laurenti R (1987) Estudo da morbidade e da mortalidade perinatal em maternidades: III - Anomalias congênitas em nascidos vivos. *Revista de Saúde Pública* 21(1):5-12. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101987000100002>.
12. Loffredo LCM, Freitas JAS, Grigolli AAG (2001) Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994. *Revista de Saúde Pública*. 35(6):571-575. <https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000600011>.
13. Owens JR, Jones JW, Harris F (1985) Epidemiology of facial clefting. *Archives of disease in childhood* 60(6):521–524. <https://doi.org/10.1136/adc.60.6.521>.
14. Monlleo IL, Gil-da-Silva-Lopes VL (2006) Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde. *Cadernos de Saúde Pública* 22(5):913-922. <https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006000500004>.
15. Amaral VLAR (1996) Aspectos psicológicos, problemas sociais e familiares associados às fissuras lábio palatinas. In: Carreirão S et al (eds) *Tratamento das fissuras labiopalatinas*. Revinter, Rio de Janeiro, pp 19-23.
16. Chan RK, Mcpherson B, Whitehill TL. Chinese attitudes toward cleft lip and palate: effects or personal contact. *Cleft Palate Craniofacial Journal*. 2006;43:731-9.
17. Silva Filho OG, Freitas JAS (2007) Caracterização Morfológica e Origem Embrionológica. In: Trindade IEK, Silva Filho OG (eds) *Fissuras Labiopalatinas: Uma Abordagem Interdisciplinar*. Santos Editora, São Paulo, pp 17-49.

18. Owens JR, Jones JW, Harris F (1985) Epidemiology of facial clefting. *Archives of disease in childhood*, 60 - 6: 521–524. <<https://doi.org/10.1136/adc.60.6.521>>.
19. Loffredo LCM, Souza JMP, Yunes J, Freitas JAS, Spiri WC (1994) Fissuras lábio-palatais: estudo caso-controle. *Revista de Saúde Pública* 28(3):213-217. <https://doi.org/10.1590/S0034-89101994000300009>.
20. Altschul SF, Madden TL, Schaffer AA, Zhang J, Zhang Z, Miller W, Lipman DJ (1997) Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. *Nucleic acids research* 25(17):3389–3402. <https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>.
21. Hatcher EL, Zhdanov SA, Bao Y, Blinkova O, Nawrocki EP, Ostapchuck Y, Schäffer AA, Brister JR (2017) Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks. *Nucleic acids research* 45(D1):D482–D490. <https://doi.org/10.1093/nar/gkw1065>.
22. Hamosh A, Scott AF, Amberger J, Valle D.; McKusick VA (2000) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM). *Human mutation*, 15(1):57–61. <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G)>.
23. Stelzer G, Rosen N, Plaschkes I, Zimmerman S, Twik M, Fishilevich S, Stein TI, Nudel R, Lieder I, Mazor Y, Kaplan S, Dahary D, Warshawsky D, Guan-Golan Y, Kohn A, Rappaport N, Safran M, Lancet D (2016) The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses. *Current protocols in bioinformatics* 54:1.30.1–1.30.33. <https://doi.org/10.1002/cpbi.5>.
24. World Health Organization – WHO (2016) Zika virus. <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>. Accessed 10 June 2020.
25. Hobman TC (2013) Rubella Virus. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 687-711.
26. Molnarova A, Palencar D, Fekiacova D et al (2018) Orofacial clefts and infections during pregnancy. *Biologia* 73(6):629–635. <https://doi.org/10.2478/s11756-018-0065-y>.

27. Guimarães GMMF, Oliveira IAS, Sousa PS, Doriqui MJR, Fiamoncini ES, Ferreira Júnior O, Consolaro A (2019) Cleft LIP and palate in babies with microcephaly by zika virus: would there be an etiopathogenic relationship?. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 48(1):21. <https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.03.060>.
28. Roizman B, Knipe D, Whitley R. Herpes Simplex Viruses. In: Knipe D, Howley P, editors. *Fields Virology. two: Wolters Kluwer Health* 2013. 2456.
29. Avila JR et al (2006) PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. *American Journal of Medical Genetics Part A* 140(23):2562-2570.
30. Lopes N, Nozawa C, Linhares REC (2014) Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. *Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua* 5(3):55-64. http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S217662232014000300007&lng=pt&nrm=iso.
31. Figueiredo LT (2000) The Brazilian flaviviruses. *Microbes and infection*, 2 (13): 1643–1649. ISSN 1286-4579 <[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01320-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01320-4)>.
32. Pauvolid-Corrêa A, Kenney JL, Couto-Lima D, Campos ZM, Schatzmayr HG, Nogueira RM, Brault AC, Komar N (2013) Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil. *PLoS neglected tropical diseases* 7(7):e2318. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002318>.
33. Santos NSO (2013) Evolução e Emergência das Virose. In: Santos NSO, Romanos MTV, Wigg MD (eds) *Introdução à Virologia Humana*, 2nd edn. Guanabara Koogan, Rio de Janeiro, pp 503-509.
34. Sousa MAC, Paraná R, Andrade LJO (2016) SEQUENCE SIMILARITY BETWEEN THYROID SELF-PROTEIN AND HEPATITIS C VIRUS POLYPROTEIN: possible triggering mechanism of autoimmune thyroiditis. *Arquivos de Gastroenterologia* 53(3):185-191. <https://doi.org/10.1590/S0004-28032016000300012>.
35. International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV (2021b) Taxonomy. Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham. <https://talk.ictvonline.org/information/newsletters/w/newsletters>. Accessed 04 January 2021.

36. Villordo SM, Carballeda JM, Filomatori CV, Gamarnik AV (2016) RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation. *Trends in microbiology* 24(4):270–283. <https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>.
37. Novella IS, Clarke DK, Quer J, Duarte EA, Lee CH, Weaver SC, Elena SF, Moya A, Domingo E, Holland JJ (1995) Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells. *Journal of virology* 69(11):6805–6809. <https://doi.org/10.1128/JVI.69.11.6805-6809.1995>.
38. Lobo FP, Mota BE, Pena SD, Azevedo V, Macedo AM, Tauch A, Machado CR, Franco GR (2009) Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts. *PloS one* 4(7):e6282. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006282>.
39. Vieira AR, Mchenry TG, Daack-Hirsch S, Murray JC, Marazita ML (2008) Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts. *Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics* 10(9):668–674. <https://doi.org/10.1097/gim.0b013e3181833793>.
40. Leslie EJ, Carlson JC, Shaffer JR, Buxó CJ, Castilla EE, Christensen K, Deleyiannis F, Field LL, Hecht JT, Moreno L, Orioli IM, Padilla C, Vieira AR, Wehby GL, Feingold E, Weinberg SM, Murray JC, Marazita ML (2017) Association studies of low-frequency coding variants in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate. *American journal of medical genetics Part A* 173(6):1531–1538. <https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38210>.
41. Zhang B, Liu C, Qian W, Han Y, Li X, Deng J (2013) Crystal structure of IL-17 receptor B SEFIR domain. *J. Immun.* 190: 2320-2322. Note: Erratum: *J. Immun.* doi: <https://doi.org/10.4049/jimmunol.1202922>.
42. Koprowski H, Hughes TP (1946) The virus of Ilhéus encephalitis; physical properties, pathogenicity and cultivation. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)* 54(4):371–385.
43. Condit RC (2013) Principles of Virology. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM (eds) *Fields virology*, 6th edn. Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, pp 21-51.

5

Considerações finais

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O potencial de causar malformações é dependente de inúmeros fatores, além do tropismo celular e do período da gestação que a infecção ocorre; considerando isso não podemos descartar que existe, mesmo que ínfimo, o potencial de qualquer vírus trazer consequências durante uma gestação, principalmente pelo fato de serem o organismo mais adaptado ao seu hospedeiro. Todavia buscando evidências para incentivar prevenção sugerimos dentro do gênero *Flavivirus* com potencial alto de causar fissuras orofaciais nas espécies de importância em saúde pública: *Dengue virus* e *West Nile virus*. Quanto aos flavivírus de emergência no Brasil apontamos a cepa Iguape vírus (espécie *Aroa virus*) com potencial alto em atuar como etiologia ambiental. As demais espécies investigadas não podem ser descartadas como fatores ambientais pois apresentaram um potencial médio nas análises realizadas.

Com base nos resultados apresentados, reiteramos a necessidade de investimentos financeiros e intelectuais na pesquisa de vírus e suas associações. Através da proposta inédita deste trabalho no contexto de etiologia de fissuras orofaciais não sindrômicas, esperamos incentivar o surgimento de uma linha investigativa, pois é inegável a presença viral em nosso meio ambiente, sobretudo com o desequilíbrio causado pela nossa espécie. Temos que nos lembrar que em infecções com potencial de gerar anomalias congênitas, não é porque não existe estudos relacionando-as diretamente, que não exista a relação, pois pouco sabemos sobre a etiologia complexa destas malformações, bem como sobre os vírus e suas interações dinâmicas com seus hospedeiros, principalmente se tratando do período gestacional.

Portanto generalizando os cuidados para com todos os flavivírus transmitidos por artrópodes é indicado o uso de repelentes, telas em janelas, eliminação de criadouros, evitar dormir com seu animal de estimação (para o caso de contato com carrapatos), uso de coleiras antipulgas e carrapatos nos pets e se atentar quanto as viagens para lugares com surtos endêmicos, principalmente se for gestante. No contexto hospitalar os profissionais da saúde, que atendem gestantes, não devem negligenciar esses vírus, sobretudo no contexto de malformações, quanto mais se apontarmos para as fissuras orofaciais. Mais uma vez, ressaltamos a necessidade de outros tipos de estudo (*in vitro* e *in vivo*) para melhor entender essas possibilidades e desenvolver melhores estratégias de controle.

Referências

REFERÊNCIAS

- AMARAL, V.L.A.R. Aspectos psicológicos, problemas sociais e familiares associados às fissuras lábio palatinas. In: CARREIRÃO, S. *et al.* Tratamento das fissuras labiopalatinas. Rio de Janeiro: **Revinter**, p. 19-23, 1996.
- ALTSCHUL, S. F.; MADDEN, T. L.; SCHAFFER, A. A.; ZHANG, J.; ZHANG, Z.; MILLER, W.; LIPMAN, D. J. **Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs.** *Nucleic acids research*, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1997. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/25.17.3389>>. Acesso em: 26 jun. 2021.
- AVILA, J.R. *et al.* PVRL1 variants contribute to non-syndromic cleft lip and palate in multiple populations. **American Journal of Medical Genetics Part A.** v.140, n.23, p. 2562-2570, 2006.
- BALTIMORE, D. Expression of animal virus genomes. **Bacteriol Rev.** v.35(3), p.235-241, 1971. DOI: 10.1128/br.35.3.235-241.1971.
- BARRETT, A.D.T. Weaver SC. Arboviroses: alphavíruses, flavivíruses and bunyavíruses. In: GREENWOOD, D. *et al.* **Medical Microbiology.** Nottingham, Leicester: **Elsevier**; p.520-536, 2012.
- BALM, M. N.; LEE, C. K.; LEE, H. K.; CHIU, L.; KOAY, E. S.; TANG, J. W. **A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika virus.** *Journal of medical virology*, v. 84, n. 9, p. 1501–1505, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jmv.23241>>. Acesso em: 26 jun. 2021.
- BEGUM, F.; DAS, S.; MUKHERJEE, D.; MAL, S.; RAY, U. Insight into the Tropism of Dengue Virus in Humans. **Viruses.** v.11(12), p.1136. Dec 9, 2019. Doi:10.3390/v11121136
- BESNARD, M.; LASTERE, S.; TEISSIER, A.; CAO-LORMEAU, V.; MUSSO, D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. **Euro Surveill.** v.19(13), p.20751. Apr 3, 2014. PMID: 24721538.
- BLITVICH, B.J.; FIRTH, A.E. A Review of Flaviviruses that Have No Known Arthropod Vector. **Viruses.** v.9 (6), p.154, 2017.
- BREITBART, M., ROHWER, F. Here a virus, there a virus, everywhere the same virus? **Trends Microbiol,** v.13, p. 278-284, 2005.

CALLIGARI, P. *et al.* Molecular Investigation of SARS-CoV-2 Proteins and Their Interactions with Antiviral Drugs. *Viruses*. v.12(4), p.445. Apr 14, 2020. Doi:10.3390/v12040445

CAO-LORMEAU, V.M.; BLAKE, A.; MONS, S.; LASTÈRE, S.; PHARM, D.; ROCHE, C. *et al.* Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet*. v.387,p.1531-1539, 2016.

CDC - **Centers for Disease Control and Prevention** [Internet]. Atlanta: United States; 2018. Disponivel em: <https://wwwnc.cdc.gov/travel/diseases/tickborne-encephalitis>. Acesso em: 8 jan. 2021.

CHAN, R.K.; MCPHERSON, B.; WHITEHILL, T.L.; Chinese attitudes toward cleft lip and palate: effects of personal contact. *Cleft Palate Craniofacial Journal*. v.43, p. 731-9, 2006.

CHATURVEDI, U.C.; MATHUR, A.; CHANDRA, A.; DAS, S.K.; TANDON, H.O.; SINGH, U.K. Transplacental infection with Japanese encephalitis virus. *Journal Infections Diseases*. v.141(6), p. 712-5. Jun, 1980. Doi: 10.1093/infdis/141.6.712. PMID: 6248601.

CHEN, R.; GUO, S.; WANG, X.; MU, Y.; DUAN, E.; XU, Y. Association of EPHA3 Gene Polymorphisms with Nonsyndromic Cleft Lip With or Without Cleft Palate. *Genet Test Mol Biomarkers*. v.22(7), p.420-424. Epub Jun 22, 2018. Doi: 10.1089/gtmb.2017.0252. PMID: 29932736.

CONDIT, R.C. Principles of Virology. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. **Fields virology. 6th ed.** Lippincott Williams & Wilkins. p. 21-51, 2013.

DA SILVA, F.C.; MAGALDI, F.M.; SATO, H.K.; BEVILACQUA, E. Yellow Fever Vaccination in a Mouse Model Is Associated With Uninterrupted Pregnancies and Viable Neonates Except When Administered at Implantation Period. *Front Microbiol*. v.20, p.245. Feb. 2020. Doi: 10.3389/fmicb.2020.00245. PMID: 32153534; PMCID: PMC7044120

DEAN, A.G.; SULLIVAN, K.M.; SOE, M.M. OpenEpi: **Open Source Epidemiologic Statistics for Public Health**. Disponivel em: www.OpenEpi.com, atualizado 2013/04/06. Acessado em 6 jun 2020.

DAVIES, S. J.; WISE, C.; VENKATESH, B.; MIRZA, G.; JEFFERSON, A.; VOLPI, E. V.; RAGOISSIS, J. Mapping of three translocation breakpoints associated with orofacial clefting within 6p24 and identification of new transcripts within the region. *Cytogenet. Genome Res.* v.105, p.47-53, 2004.

DIVÉ, I.; VEJE, M.; DOBLER, G.; BERGSTRÖM, T.; BUXMANN, H.; PAUL, B.; NÜRNBERGER, L. Tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection in pregnancy: Absence of virus transmission to the fetuses despite severe maternal disease – A case study. *Ticks and Tick-Borne Diseases*, v.11(5), p.491, 2020. Doi:10.1016/j.ttbdis.2020.101491.

DIXON, M.J.; MARAZITA, M.L.; BEATY, T.H.; MURRAY, J.C. Cleft lip and palate: understanding genetic and environmental influences. *Nat Rev Genet.* 2011; 12: 167-78.

FRASER F. C.; GWYN A. **Seasonal variation in birth date of children with cleft lip.** *Teratology*, v. 57, n. 2, p. 93-95, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1096-9926\(199802\)57:2<93::AID-TERA8>3.0.CO;2-7](https://doi.org/10.1002/(SICI)1096-9926(199802)57:2<93::AID-TERA8>3.0.CO;2-7)>. Acesso em: 10 jan. 2020.

FREITAS, J.A.S; NEVES, L.T; ALMEIDA, A.L.P.F; GARIB, D.G. *et al.* Rehabilitative treatment of cleft lip and palate: experience of the Hospital for Rehabilitation of Craniofacial Anomalies/USP (HRAC/USP) - Part 1: overall aspects. *Journal of Applied Oral Science* [online]. 2012, v. 20, n. 1. Acesso em: 10 de ago. 2021.

FIGUEIREDO, L. T. **The Brazilian flaviviruses.** *Microbes and infection*, v. 2, n. 13, p. 1643–1649, 2000. ISSN 1286-4579. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/S1286-4579\(00\)01320-4](https://doi.org/10.1016/S1286-4579(00)01320-4)>. Acesso em: 10 jan. 2020.

FIGUEIREDO, L. T. M. **Arboviroses emergentes no Brasil.** *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* [online], v. 40, n. 2, p. 224-229, 2007. ISSN 1678-9849. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0037-86822007000200016>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

FONTELES, C. S. R.; RIBEIRO, E. M.; SANTOS, M. S. A.; LEITE, R. F. P.; ASSUNÇÃO, G. S.; MONTEIRO, A. J.; PESSOA, A. L. S.; GIACHETI, C. M.; KERBAGE, S. C.; RIBEIRO, T. R.; CAVALCANTI, L. P. G. **Lingual Frenulum Phenotypes in Brazilian Infants With Congenital Zika Syndrome.** *The Cleft palate-craniofacial journal: official publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, v. 55, n. 10, p. 1391–1398, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1177/1055665618766999>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

FOY, B. D.; KOBYLINSKI, K. C.; FOY, J. L. C.; BLITVICH, B. J.; ROSA, A. T.; HADDOW, A. D.; LANCIOTTI, R. S.; TESH, R. B. **Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA**. *Emerging infectious diseases*, v. 17, n. 5, p. 880–882, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid1705.101939>>. Acesso em 26 jun. 2021.

GEORGE, S. E.; SIMOKAT, K.; HARDIN, J.; CHISHOLM, A. D. **The VAB-1 Eph receptor tyrosine kinase functions in neural and epithelial morphogenesis in *C. elegans***. *Cell*, v. 92, n. 5, p. 633–643, 1998. Disponível em: <[https://doi.org/10.1016/s0092-8674\(00\)81131-9](https://doi.org/10.1016/s0092-8674(00)81131-9)>. Acesso em: 26 jun. 2021.

GORABI, A. M.; HAJIGHASEMI, S.; TAFTI, H. A.; ATASHI, A.; SOLEIMANI, M.; AGHDAMI, N.; SAEID, A. K.; KHORI, V.; PANAH, Y.; SAHEBKAR, A. **TBX18 transcription factor overexpression in human-induced pluripotent stem cells increases their differentiation into pacemaker-like cells**. *Journal of cellular physiology*, v. 234, n. 2, p. 1534–1546, 2019. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/jcp.27018>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

GUBLER, D. J. **Human Arbovirus Infections Worldwide**. *Annals of the New York Academy of Sciences*, v. 951 n. 1, p. 13-24, 2001. Disponível em: <<https://doi.org/10.1111/j.1749-6632.2001.tb02681.x>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

GUIMARÃES, G. M. M. F.; OLIVEIRA, I. A. S.; SOUSA, P. S.; DORIQUE, M. J. R.; FIAMONCINI, E. S.; FERREIRA JÚNIOR, O.; CONSOLARO, A. **Cleft LIP and palate in babies with microcephaly by zika virus: would there be an etiopathogenic relationship?**. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 48, n. 1, p. 21, 2019. ISSN 0901-5027. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijom.2019.03.060>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

HATCHER, E. L.; ZHDANOV, S. A.; BAO, Y.; BLINKOVA, O.; NAWROCKI, E. P.; OSTAPCHUCK, Y.; SCHÄFFER, A. A.; BRISTER, J. R. **Virus Variation Resource - improved response to emergent viral outbreaks**. *Nucleic acids research*, v. 45, D1, D482–D490, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkw1065>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

HEISE, M. T.; VIRGIN, H. W. **Pathogenesis of Viral Infection**. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields virology*. 6th ed. Lippincott Williams & Wilkins; p. 254-285, 2013.

HELENIUS, A. **Virus Entry and Uncoating**. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields virology*. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins; p. 87-104, 2013.

HILLS, S. L.; RUSSELL, K.; HENNESSEY, M.; WILLIAMS, C.; OSTER, A. M.; FISCHER, M.; MEAD, P. **Transmission of Zika Virus Through Sexual Contact with Travelers to Areas of Ongoing Transmission - Continental United States, 2016**. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report*, v. 65, n. 8, p. 215–216, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6508e2>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

HOBMAN, T. C. **Rubella Virus**. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. *Fields virology*. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins; p. 687-711, 2013

HOHENAUER, T.; MOORE, A. W. The **Prdm family: expanding roles in stem cells and development**. *Development (Cambridge, England)*, v. 139, n. 13, p. 2267–2282. Disponível em: <<https://doi.org/10.1242/dev.070110>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

Hospital de Reabilitação de Anomalias Craniofaciais da Universidade de São Paulo (HRAC/USP) **Fissura Labiopalatina** [Internet]. São Paulo, 2021. Disponível em: <<http://hrac.usp.br/saude/fissura-labiopalatina/>>. Acesso em: 15 fev. 2021.

HULO, C.; DE CASTRO, E.; MASSON, P.; BOUGUELERET, L.; BAIROCH, A.; XENARIOS, I.; LE MERCIER, P. **ViralZone: a knowledge resource to understand virus diversity**. *Nucleic acids research*, v. 39, p. 576–582, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/nar/gkq901>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE). **Pesquisa por cobertura vegetal e outras áreas**. BDIA - Banco de Dados de Informações Ambientais [Internet], 2021. Disponível em: <<https://bdiaweb.ibge.gov.br/#/consulta/vegetacao>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Taxonomy** [Internet]. Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, 2021. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/information/newsletters/w/newsletters>>. Acesso em: 04 jan. 2021.

_____. **Information: newsletters** [Internet]. Department of Microbiology, University of Alabama at Birmingham, Birmingham, 2021b. Disponível em: <<https://talk.ictvonline.org/information/newsletters/w/newsletters>>. Acesso em: 04 jan. 2021.

KAISER, R. **Tick-borne encephalitis**. *Infectious disease clinics of North America*, v. 22, n. 3, 561–575, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.idc.2008.03.013>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

KITCHEN, A.; SHACKELTON, L. A.; HOLMES, E. C. **Family level phylogenies reveal modes of macroevolution in RNA viruses**. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, v. 108, n. 1, p. 238–243, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1073/pnas.1011090108>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

KOONIN, E. V.; SENKEVICH, T. G.; DOLJA, V. V. **The ancient Virus World and evolution of cells**. *Biology direct*, v. 1, n. 29, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1745-6150-1-29>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

KOPROWSKI, H.; HUGHES, T. P. **The virus of Ilhéus encephalitis; physical properties, pathogenicity and cultivation**. *Journal of immunology (Baltimore, Md.: 1950)*, v. 54, n. 4, p. 371–385, 1946.

KUMAR, S.; STECHER, G.; TAMURA, K. **MEGA7: Molecular Evolutionary Genetics Analysis Version 7.0 for Bigger Datasets**. *Molecular biology and evolution*, v. 33, n. 7, p. 1870–1874, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1093/molbev/msw054>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LABUDA, M.; AUSTYN, J. M.; ZUFFOVA, E.; KOZUCH, O.; FUCHSBERGER, N.; LYSY, J.; NUTTALL, P. A. **Importance of localized skin infection in tick-borne encephalitis virus transmission**. *Virology*, v. 219, n. 2, p. 357–366, 1996. Disponível em: <<https://doi.org/10.1006/viro.1996.0261>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LESLIE, E. J.; CARLSON, J. C.; SHAFFER, J. R.; BUXÓ, C. J.; CASTILLA, E. E.; CHRISTENSEN, K.; DELEYIANNIS, F.; FIELD, L. L.; HECHT, J. T.; MORENO, L.; ORIOLI, I. M.; PADILLA, C.; VIEIRA, A. R.; WEHBY, G. L.; FEINGOLD, E.; WEINBERG, S. M.; MURRAY, J. C.; MARAZITA, M. L. **Association studies of low-frequency coding variants in nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate**. *American journal of medical genetics. Part A*, v. 173, n. 6, p. 1531–1538, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/ajmg.a.38210>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LIM, P. Y.; BEHR, M. J.; CHADWICK, C. M.; SHI, P. Y.; BERNARD, K. A. **Keratinocytes are cell targets of West Nile virus in vivo**. *Journal of virology*, v. 85, n. 10, p. 5197-5201, 2011. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JVI.02692-10>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LINDENBACH B. D.; MURRAY C. L.; THIEL H. J.; et al. **Flaviviridae**. In: **Fields BN, Knipe DM, Howley PM**. *Fields virology*. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 712-746.

LOBO, F. P.; MOTA, B. E.; PENA, S. D.; AZEVEDO, V.; MACEDO, A. M.; TAUCH, A.; MACHADO, C. R.; FRANCO, G. R. **Virus-host coevolution: common patterns of nucleotide motif usage in Flaviviridae and their hosts**. *PloS one*, v. 4, n. 7, e6282, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0006282>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LOFIEGO, J. L. **Embriologia**. In: **Fissura Lábio Palatina: Avaliação, diagnóstico e tratamento fonoaudiólogo**. Revinter, Rio de Janeiro, p. 20-44, 1992.

LOFFREDO, L. C. M.; SOUZA, J. M. P.; YUNES J.; FREITAS J. A. S.; SPIRI, W. C. **Fissuras lábio-palatais: estudo caso-controle**. *Revista de Saúde Pública* [online], v. 28, n. 3, p. 213-217, 1994. ISSN 1518-8787. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89101994000300009>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LOFFREDO, L. C. M.; FREITAS, J. A. S.; GRIGOLLI, A. A. G. **Prevalência de fissuras orais de 1975 a 1994**. *Revista de Saúde Pública* [online], v. 35, n. 6, p. 571-575, 2001. ISSN 1518-8787. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89102001000600011>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R. E. C. **Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil**. *Revista Pan-Amazônica de Saúde, Ananindeua*, v. 5, n. 3, p. 55-64, set. 2014. ISSN 2176-6223. Disponível em <http://scielo.iec.gov.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2176-62232014000300007&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 22 jul. 2021.

LUDWIG, K. U.; MANGOLD, E.; HERMS, S.; NOWAK, S.; REUTTER, H.; PAUL, A.; BECKER, J.; HERBERZ, R.; ALCHAWA, T.; NASSER, E.; BÖHMER, A. C.; MATTHEISEN, M.; ALBLAS, M. A.; BARTH, S.; KLUCK, N.; LAUSTER, C.; BRAUMANN, B.; REICH, R. H.; HEMPRICH, A.; PÖTZSCH, S.; et. al. **Genome-wide meta-analyses of nonsyndromic cleft lip with or without cleft palate identify six new risk loci**.

Nature genetics, v. 44, n. 9, p. 968–971, 2012. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ng.2360>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

LUO, H.; WINKELMANN, E. R.; FERNANDEZ-SALAS, I.; LI, L.; MAYER, S. V.; DANIS-LOZANO, R.; SANCHEZ-CASAS, R. M.; VASILAKIS, N.; TESH, R.; BARRETT, A. D.; WEAVER, S. C.; WANG, T. **Zika, dengue and yellow fever viruses induce differential antiviral immune responses in human monocytic and first trimester trophoblast cells.** Antiviral research, v. 151, p. 55–62, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.01.003>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MACKENZIE, J. S.; GUBLER, D. J.; PETERSEN, L. R. **Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses.** Nature medicine, v. 10, n. 12, p. 98–109, 2004. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/nm1144>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MANSFIELD, K. L.; JOHNSON, N.; PHIPPS, L. P.; STEPHENSON, J. R.; FOOKS, A. R.; SOLOMON, T. **Tick-borne encephalitis virus - a review of an emerging zoonosis.** The Journal of general virology, v. 90, n. 8, p. 1781–1794, 2009. Disponível em: <<https://doi.org/10.1099/vir.0.011437-0>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MESSIAS, T. S.; SILVA, K. C. P.; RICHINI-PEREIRA, V. B. Presença de Mutações em cepas de Zika virus associadas a microcefalia: Uma análise in silico. In: DALAZOANA, K. Fundamentos e Aplicações da Biologia. Atena Editora, 2019. p. 172-176, 2019. DOI 10.22533/at.ed.45019050719.

MOLNAROVA, A.; PETROVICOVA, A.; FEDELES, J.; BOPEGAMAGE, S.; HORAKOVA, E. **Coxsackie viral infection and orofacial cleft.** Bratislavske lekarske listy, v. 103, n. 10, p. 365–367, 2002.

MOLNAROVA, A.; PALENCAR, D.; FEKIACOVA, D. et al. **Orofacial clefts and infections during pregnancy.** Biologia, v. 73, n. 6, p. 629–635, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.2478/s11756-018-0065-y>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MONLLEO, I. L.; GIL-DA-SILVA-LOPES, V. L. **Anomalias craniofaciais: descrição e avaliação das características gerais da atenção no Sistema Único de Saúde.** Cadernos de Saúde Pública [online], v. 22, n. 5, p. 913-922, 2006. ISSN 1678-4464. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0102-311X2006000500004>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MOORE, C. G.; MCLEAN, R. G.; MITCHELL, C. J.; NASCI, R. S.; TSAI, T. F.; CALISHER, C. H.; et al. **Guidelines for arbovirus surveillance programs in the United States**. Fort Collins, CO: Centers for Disease Control and Prevention, v. 500, p. 36-40, 1993.

HAMOSH, A.; SCOTT, A. F.; AMBERGER, J.; VALLE, D.; MCKUSICK, V. A. **Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM)**. Human mutation, v. 15, n. 1, p. 57–61, 2000. Disponível em: <[https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1098-1004\(200001\)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G](https://doi.org/10.1002/(SICI)1098-1004(200001)15:1<57::AID-HUMU12>3.0.CO;2-G)>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MANIATIS, T.; FRITISH, E. R.; SAMBROOK, D. R. **Molecular cloning: a laboratory manual**. Cold Spring Harbor, 1. ed. New York: Cold Spring Harbor Laboratory, 545 p., 1982.

MUSSO, D.; NHAN, T.; ROBIN, E.; ROCHE, C.; BIERLAIRE, D.; ZISO, K.; SHAN YAN, A.; CAO-LORMEAU, V. M.; BROULT, J. **Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014**. Euro surveillance: bulletin Europeen sur les maladies transmissibles (European communicable disease bulletin), v. 19, n. 14, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.2807/1560-7917.es2014.19.14.20761>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

MUSSO D. **Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil**. Emerging infectious diseases, v. 21, n. 10, p. 1887, 2015. Disponível em: <<https://doi.org/10.3201/eid2110.151125>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

NAZER, J.; HUBNER, M. E.; CATALAN, J.; CIFUENTES, L. **Incidência de lábio leporino y paladar hendido en la Maternidad Del Hospital Clínico de la Universidad de Chile y en las maternidades chilenas participantes en el Estudio Colaborativo Latino Americano de Malformaciones Congênitas (ECLAMC)**. Rev. méd. Chile, Santiago, v. 129, n. 3, p. 285-293, 2001. Disponível em: <http://www.scielo.cl/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-98872001000300008&lng=en&nrm=iso>. Acesso em: 24 jun. 2021.

NAGEM FILHO, H.; MORAES, N.; ROCHA, R. G. F. **Contribuição para o estudo da prevalência das más formações congênitas lábio-palatais na população escolar de Bauru**. Revista da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, São Paulo, v. 6, n. 2, p. 111-128, 1968. ISSN: 0581-6866.

NCBI - National Center for Biotechnology Information. **Basic Local Alignment Search Tool**, Version 2.5.0 [Software], 2018. Disponível em: <<https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

_____. **Bethesda** [Internet], 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>>. Acesso em: 26 fev. 2018.

NOVELLA, I. S.; CLARKE, D. K.; QUER, J.; DUARTE, E. A.; LEE, C. H.; WEAVER, S. C.; ELENA, S. F.; MOYA, A.; DOMINGO, E.; HOLLAND, J. J. **Extreme fitness differences in mammalian and insect hosts after continuous replication of vesicular stomatitis virus in sandfly cells**. *Journal of virology*, v. 69, n. 11, p. 6805–6809, 1995. Disponível em: <<https://doi.org/10.1128/JVI.69.11.6805-6809.1995>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

OHNO, Y.; KAMIYAMA, N.; NAKAMICHI, S.; KIHARA, A. **PNPLA1 is a transacylase essential for the generation of the skin barrier lipid ω -O-acylceramide**. *Nature communications*, v. 8, 14610, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/ncomms14610>>. Acesso em 26 jun. 2021.

O'LEARY, D. R.; KUHN, S.; KNISS, K. L.; HINCKLEY, A. F.; RASMUSSEN, S. A.; PAPE, W. J.; KIGHTLINGER, L. K.; BEECHAM, B. D.; MILLER, T. K.; NEITZEL, D. F.; MICHAELS, S. R.; CAMPBELL, G. L.; LANCIOTTI, R. S.; HAYES, E. B. **Birth outcomes following West Nile Virus infection of pregnant women in the United States: 2003-2004**. *Pediatrics*, v. 117, n. 3, p. 537-545, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1542/peds.2005-2024>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

OWENS, J. R.; JONES, J. W.; HARRIS, F. **Epidemiology of facial clefting**. *Archives of disease in childhood*, v. 60, n. 6, p. 521–524, 1985. Disponível em: <<https://doi.org/10.1136/adc.60.6.521>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

PATEL, P.; LANDT, O.; KAISER, M.; FAYE, O.; KOPPE, T.; LASS, U.; SALL, A. A.; NIEDRIG, M. **Development of one-step quantitative reverse transcription PCR for the rapid detection of flaviviruses**. *Virology journal*, v. 10, n. 58, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/1743-422X-10-58>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

PAUVOLID-CORRÊA, A.; KENNEY, J. L.; COUTO-LIMA, D.; CAMPOS, Z. M.; SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M.; BRAULT, A. C.; KOMAR, N. **Ilheus virus isolation in the Pantanal, west-central Brazil**. *PLoS neglected tropical diseases*, v. 7, n. 7,

e2318, 2013. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002318>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

PETERSEN, L. R.; JAMIESON, D. J.; POWERS, A. M.; HONEIN, M. A. **Zika Virus**. The New England journal of medicine, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

PIERSON, T. C, DIAMOND, M. S. **Flaviviruses**. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2013. p. 747-794.

PIERSON, T. C; LAZEAR, H. M; DIAMOND, M. S. **Flaviviruses: Dengue, Zika, West Nile, Yellow Fever and Other Flaviviruses**. In: Fields BN, Knipe DM, Howley PM. Fields virology. 7. ed. Lippincott Williams & Wilkins; 2020. p. 345-409.

RASMUSSEN, S. A.; JAMIESON, D. J.; HONEIN, M. A.; PETERSEN, L. R. **Zika Virus and Birth Defects--Reviewing the Evidence for Causality**. The New England journal of medicine, v. 374, n. 20, p. 1981–1987, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1056/NEJMs1604338>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

RATHER, I. A.; KUMAR, S.; BAJPAI, V. K.; LIM, J.; PARK, Y. H. **Prevention and Control Strategies to Counter ZIKA Epidemic**. Frontiers in microbiology, v. 8, n. 305, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.3389/fmicb.2017.00305>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

RIBEIRO, C. F.; LOPES, V.; BRASIL, P.; PIRES, A.; ROHLOFF, R.; NOGUEIRA, R. **Dengue infection in pregnancy and its impact on the placenta**. International journal of infectious diseases (IJID): official publication of the International Society for Infectious Diseases, v. 55, p. 109–112, 2017. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ijid.2017.01.002>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; et al. **Diagnosis and outcomes of pregnant women with Zika virus infection in two municipalities of Risaralda, Colombia: Second report of the ZIKERNCOL study**. Travel medicine and infectious disease, v. 25, p. 20–25, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tmaid.2018.06.006>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SANTOS, N. S. O. **Evolução e Emergência das Viroses**. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. ed. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 503-509, 2013.

SILVA FILHO, O. G.; FREITAS, J. A. S. **Caracterização Morfológica e Origem Embriológica**. In: TRINDADE, I.E.K.; SILVA FILHO, O.G. **Fissuras Labiopalatinas: Uma Abordagem Interdisciplinar**. São Paulo: Santos Editora, p. 17-49, 2007.

SPINA, V.; PSILLAKIS, J. M.; LAPA, F. S.; FERREIRA, M. C. **Classificação das fissuras lábio-palatinas: sugestão de modificação**. Revista do Hospital Faculdade de Medicina de São Paulo, v. 27, n. 1, p. 5-6, 1972.

SCHNEIDER, B. S.; HIGGS, S. **The enhancement of arbovirus transmission and disease by mosquito saliva is associated with modulation of the host immune response**. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, v. 102, n. 5, p. 400–408, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.trstmh.2008.01.024>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SCHNEIDER, B. S.; SOONG, L.; GIRARD, Y. A.; CAMPBELL, G.; MASON, P.; HIGGS, S. **Potential of West Nile encephalitis by mosquito feeding**. Viral immunology, v. 19, n. 1, p. 74–82, 2006. Disponível em: <<https://doi.org/10.1089/vim.2006.19.74>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SHEN, S. C.; SHEN, C. I.; LIN, H.; CHEN, C. J.; CHANG, C. Y.; CHEN, S. M.; et al. **Susceptibility of Human Embryonic Stem Cell-Derived Neural Cells to Japanese Encephalitis Virus Infection**. PLoS ONE, v. 9, n. 12, e114990, 2014. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0114990>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SOUZA, J. M. P.; BUCHALLA, C. M.; LAURENTI, R. **Estudo da morbidade e da mortalidade perinatal em maternidades: III - Anomalias congênitas em nascidos vivos**. Revista de Saúde Pública [online], v. 21, n. 1, p. 5-12, 1987. ISSN 1518-8787. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0034-89101987000100002>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SOUSA, M. A. C.; PARANÁ, R.; ANDRADE, L. J. O. **SEQUENCE SIMILARITY BETWEEN THYROID SELF-PROTEIN AND HEPATITIS C VIRUS POLYPROTEIN: possible triggering mechanism of autoimmune thyroiditis**. Arquivos de Gastroenterologia [online], v. 53, n. 3, p. 185-191, 2016. ISSN 1678-4219. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/S0004-28032016000300012>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SOUZA, M. T.; SILVA, M. D.; CARVALHO, R. **Revisão integrativa: o que é e como fazer**. Einstein (São Paulo), São Paulo, v. 8, n. 1, p. 102-106, 2010. Disponível em: <<https://doi.org/10.1590/s1679-45082010rw1134>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

SPINA, V.; PSILLAKIS, J.M.; LAPA, F.S.; FERREIRA, M.C. **Classificação das fissuras lábio-palatais: sugestão de modificação**. Rev. Hosp. Clín. Fac. Med. USP, São Paulo, v. 27, n. 1, p. 5-6, 1972.

STELZER, G.; ROSEN, N.; PLASCHKES, I.; ZIMMERMAN, S.; TWIK, M.; FISHILEVICH, S.; STEIN, T. I.; NUDEL, R.; LIEDER, I.; MAZOR, Y.; KAPLAN, S.; DAHARY, D.; WARSHAWSKY, D.; GUAN-GOLAN, Y.; KOHN, A.; RAPPAPORT, N.; SAFRAN, M.; LANCET, D. **The GeneCards Suite: From Gene Data Mining to Disease Genome Sequence Analyses**. Current protocols in bioinformatics, v. 54, p. 1.30.1–1.30.33, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/cpbi.5>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

TIESSEN, R. G.; VAN ELSACKER-NIELE, A. M.; VERMEIJ-KEERS, C.; OEPKES, D.; VAN ROOSMALEN, J.; GORSIRA, M. C. **A fetus with a parvovirus B19 infection and congenital anomalies**. Prenatal diagnosis, v. 14, n. 3, p. 173–176, 1994. Disponível em: <<https://doi.org/10.1002/pd.1970140305>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

TORANZO FERNÁNDEZ J. M.; METLICH MEDLICH, M. A.; SANTOS DIAZ, M. A.; VEGA ESTRADA, N. L. **Fissura lábio-palatina: análisis epidemiológico de 121 pacientes**. Rev ADM. 1993, v. 50, n. 3, p. 165-7, 1993.

University of Toronto (UT). **Bioinformatic Methods I, II and Plants [online]**. Department of Cell & Systems Biology, Canada: Toronto, 2020. Disponível em: <<https://www.coursera.org/learn/bioinformatikamethods2>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

VASQUEZ, A. M.; SAPIANO, M. R.; BASAVARAJU, S. V.; KUEHNERT, M. J.; RIVERA-GARCIA, B. **Survey of Blood Collection Centers and Implementation of Guidance for Prevention of Transfusion-Transmitted Zika Virus Infection — Puerto Rico, 2016**. Morbidity and Mortality Weekly Report (MMWR), v. 65, p. 375–378, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.15585/mmwr.mm6514e1>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

VERLI, H. **Bioinformática da Biologia à flexibilidade molecular**. 1. ed. São Paulo: SBBq; 2014. p. 282.

VILLORDO, S. M.; CARBALLEDA, J. M.; FILOMATORI, C. V.; GAMARNIK, A. V. **RNA Structure Duplications and Flavivirus Host Adaptation**. Trends in microbiology, v. 24, n. 4, p. 270–283, 2016. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.tim.2016.01.002>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

WHELAN, S. **Viral Replication Strategies**. In: FIELDS, B.N.; KNIPE, D.M.; HOWLEY, P.M. Fields virology. 6. ed. Lippincott Williams & Wilkins; p. 105-126, 2013.

WIGG, M. D.; MARANHÃO, A. G.; SANTOS, N. S. O. et al. **Viroses Congênitas**. In: SANTOS, N. S. O.; ROMANOS, M. T. V.; WIGG, M. D. **Introdução à Virologia Humana**. ed. 2. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, p. 212-244, 2013.

World Health Organization (WHO). **Arboviruses and human disease: report of a WHO scientific group [meeting held in Geneva from 26 September to 1 October 1966]**. World Health Organization technical report series, v. 369, p. 84, 1967. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/40664>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

_____. **Congenital anomalies** [Internet]. 2020. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>>. Acesso em: 10 jun. 2018.

_____. **Zika virus** [Internet]. 2016. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/en/>>. Acessado em: 10 jun. 2018.

VIEIRA, A. R.; MCHENRY, T. G.; DAACK-HIRSCH, S.; MURRAY, J. C.; MARAZITA, M. L. **Candidate gene/loci studies in cleft lip/palate and dental anomalies finds novel susceptibility genes for clefts**. Genetics in medicine: official journal of the American College of Medical Genetics, v. 10, n. 9, p. 668–674, 2008. Disponível em: <<https://doi.org/10.1097/gim.0b013e3181833793>>. Acesso em: 26 jun. 2021.

Anexos

ANEXO A – Declaração de uso exclusivo de artigo a ser publicado em periódico de língua inglesa.

DECLARATION OF EXCLUSIVE USE OF THE ARTICLE IN THESIS

We hereby declare that we are aware of the article - The flaviviruses potential for public health importance as etiology of environmental factor in nonsyndromic cleft lip and/or palate - will be included in Thesis of the student Kaique Cesar de Paula Silva was not used and may not be used in other works of Graduate Programs at the Bauru School of Dentistry, University of São Paulo.

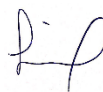
Bauru, 03 de setembro de 2021.

Kaique Cesar de Paula Silva
Author



Signature

Simone Soares
Author



Signature

ANEXO B – Guideline de submissão utilizado para confecção do artigo - The flaviviruses potential for public health importance as etiology of environmental factor in nonsyndromic cleft lip and/or palate.

Brazilian Journal of Microbiology Submission Guidelines

Last update: March 2021



The official journal of the Brazilian Society of Microbiology

Online ISSN: 1678-4405

Fonte: Brazilian Journal of Microbiology. Disponível em:
<<https://www.springer.com/journal/42770/>>. Acesso em 18/08/2021

ANEXO C – Declaração de uso exclusivo de artigo a ser publicado em periódico de língua inglesa.

DECLARATION OF EXCLUSIVE USE OF THE ARTICLE IN THESIS

We hereby declare that we are aware of the article - Investigation of flaviviruses emerging in Brazil as etiology of environmental factor in nonsyndromic cleft lip and/or palate - will be included in Thesis of the student Kaique Cesar de Paula Silva was not used and may not be used in other works of Graduate Programs at the Bauru School of Dentistry, University of São Paulo.

Bauru, 03 de setembro de 2021.

Kaique Cesar de Paula Silva
Author



Signature

Simone Soares
Author



Signature

**ANEXO D – Guideline de submissão utilizado para confecção do artigo
Investigation of flaviviruses emerging in Brazil as etiology of environmental
factor in nonsyndromic cleft lip and/or palate.**



The screenshot shows the website for 'The Cleft Palate-Craniofacial Journal'. The header includes the journal title, the American Cleft Palate-Craniofacial Association logo, and impact factor information (1.433, 5-Year Impact Factor 1.687). A navigation bar contains links for 'Journal Home', 'Browse Journal', 'Journal Info', 'Stay Connected', and a prominent red 'Submit Paper' button. Below the navigation, the 'Submit Paper' section features a checklist icon and a message: 'Please read the guidelines below before visiting the submission site!' with a red 'Submission Site' button. To the right, there is a vertical menu with 'All Issues', 'Current Issue', and 'OnlineFirst' buttons. The text 'Manuscript Submission Guidelines:' is visible below the main message.

Fonte: The Cleft Palate-Craniofacial Journal Disponível em:
<<https://journals.sagepub.com/author-instructions/CPC>>. Acesso em 18/08/2021.