



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS
DEPARTAMENTO DE BIOLOGIA CELULAR, EMBRIOLOGIA E GENÉTICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E DO
DESENVOLVIMENTO

Camila Santos de Souza

**Análise da influência do vírus da Zika sobre a sinalização de Ácido Retinóico no
desenvolvimento craniofacial**

Florianópolis

2023

Camila Santos de Souza

Análise da influência do vírus da Zika sobre a sinalização de Ácido Retinóico no desenvolvimento craniofacial

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento

Orientador: Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.

Florianópolis

2023

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Souza, Camila Santos de

Análise da influência do vírus da Zika sobre a sinalização de Ácido Retinóico no desenvolvimento craniofacial / Camila Santos de Souza ; orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2023.

68 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. Biologia do Desenvolvimento. 3. Zika Vírus. 4. Ácido Retinóico. 5. Microcefalia. I. Garcez, Ricardo Castilho. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Camila Santos de Souza

Análise da influência do vírus da Zika sobre a sinalização de Ácido Retinóico no desenvolvimento craniofacial

O presente trabalho em nível de mestrado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Geisson Marcos Nardi, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Giordano Wosgrau Calloni, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2023.

**Dedico este trabalho ao meu orientador, à minha família e a meus amigos por
todo o auxílio e incentivo proporcionados até aqui**

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus, seja qual for sua forma. Agradeço por ter me proporcionado tanta força, para que eu pudesse passar pelas dificuldades da vida e chegar até aqui, onde jamais imaginei que poderia chegar. Admiro com fascínio o universo, e quanto mais o conheço, através da ciência, mais conheço a Deus.

Agradeço ao meu orientador, o professor Ricardo Castilho Garcez, por tantos ensinamentos durante o mestrado. Não o conhecia antes de ser selecionada para o nosso laboratório, mas devo dizer que o ter como orientador foi uma surpresa muito boa. Não posso expressar em palavras a gratidão que sinto por ter tido a oportunidade de aprender com uma pessoa tão incrível, e tudo que vivi durante esse tempo superou minhas expectativas. Tenho certeza que muito do que vi e aprendi vou levar para toda a minha vida, para além dos aspectos profissionais. Foi uma honra ter podido aprender tanto, e em tantos sentidos, com um cientista incrível como você. É um privilégio poder aprender com quem admiramos.

Agradeço aos nossos colaboradores do Instituto Carlos Chagas – FIOCRUZ Paraná, Camila Zanluca, Juliano Bordignon e Cláudia Duarte Santos por todo o suporte ao nosso projeto, com a doação das alíquotas virais e dos suprimentos para a RT-qPCR do Zika. Ao professor Daniel Mansur, pela disponibilização das alíquotas virais quantificadas. Ao professor Edmundo Grisard e sua aluna Larissa, por nos permitir usar o Picrodrop para a dosagem das amostras. Ao professor Fabiano Dahlke e ao Sebastião, do Centro de Ciências Agrárias da UFSC, pela doação dos ovos utilizados nos nossos experimentos. Ao LAMEB e sua equipe pela disponibilização de equipamentos. À Paula, por todo o auxílio no desenvolvimento e entendimento de fórmulas e tabelas importantes neste estudo. À Alexandra Elbakyan por acreditar na democratização da ciência. À FAPEU, pelo gerenciamento dos recursos do projeto e da minha bolsa. À CAPES, CNPq e MCTI pelos financiamentos através da PL 41850003/2021; 71260014/2020.

Gostaria de agradecer também aos meus pais, que sempre me incentivaram a estudar. Agradeço por sempre me lembrarem que os estudos são a maior herança que poderiam me deixar. Vocês me ensinaram a ter fé e coragem, me apoiando tanto para vir para Florianópolis, mesmo com algumas dificuldades. Não posso expressar em palavras o tamanho da minha gratidão. Tenho muito orgulho de toda a trajetória de vocês, e de todo o esforço que fizeram para que eu e meu irmão tivéssemos uma vida digna.

Agradeço a meus colegas e amigos do Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), Victor, Monique, Polli, Maiara, Isa, Karynne, Lucas, Profa Talita, Profa Andrea e aos novos integrantes por todas as trocas de saberes, incentivos, risos e apoio. Agradeço à Nathali, pelo companheirismo durante esta curta jornada. Agradeço ao Peterson e a Dani, pela amizade incrível que tive o prazer de compartilhar. Agradeço também à Pri, que sempre se empolgou muito com nosso projeto e sempre mostrou muito carinho por nós da Biomol. Foi muito bom poder construir um pouco da minha história ao lado de todos vocês.

Agradeço ao meu amigo Felipe Benevenuti, por todo o auxílio com o projeto do Zika. Foi incrível trabalhar com alguém que se empolga tanto no que faz. Agradeço muito por ter sido tão querido, por compartilhar o seu conhecimento e por sempre estar disposto a me ajudar com minhas dificuldades. Eu estava em um lugar novo, com pessoas que não conhecia, e você com certeza foi muito importante para me ajudar nessa adaptação. Posso dizer que foi minha primeira amizade em Florianópolis, que com certeza vou levar para sempre no meu coração. Infelizmente, não podemos nos ver por causa da distância, mas tenho certeza que está construindo um lindo caminho para ser um cientista brilhante em São Paulo. Espero muito que algum dia possamos nos ver novamente, e ter altas aventuras ouvindo IZA e Anitta. Você é incrível!!

Agradeço ao pessoal do Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (LIAA), por tantos momentos inesquecíveis. Agradeço em especial à Bê, por todo o incentivo e apoio, pelos momentos de descontração e sobretudo pela amizade. Foi incrível poder te conhecer, trocar experiências, ideias e risadas contigo. Agradeço também por ter me apresentado a Mai, que também é maravilhosa e uma cientista igualmente incrível.

Agradeço aos meus amigos de Juiz de Fora, por sempre me mostrarem tanto apoio. Agradeço em especial à Luana, Micaela, Lara, Jéssica, Yuri, Bruno, Leo, Amanda e todos que sempre estiveram do meu lado, que mesmo com toda a distância, sempre me incentivaram e demonstraram tanta felicidade com minhas conquistas. De São Paulo, agradeço ao meu amigo Arthur, pela fidelidade incrível que sempre me mostrou. Sei que posso contar com você independente do que, quando e onde for. Agradeço também ao Gui, pelas conversas sobre os dilemas da vida que me fizeram refletir muito sobre o caminho que escolhi seguir.

Agradeço às Bonitinhas da vovó, Lud, Ana Bia, Lu e Birubinha pelos rolês, pela amizade e pelo apoio que sempre me mostraram. Ver o fascínio de vocês quando eu falava

sobre ciência é um incentivo para eu continuar pela carreira acadêmica. Agradeço em especial à Manu, que se tornou alguém tão importante em tão pouco tempo. Foi um prazer imenso poder te conhecer e compartilhar um apoio mútuo em momentos de dificuldade. Compartilhar tantos momentos gostosos com todas foi um prazer, e fizeram minha estadia em Florianópolis inesquecível. Agradeço a todas por tantos momentos únicos, que com certeza me trouxeram mais leveza neste finalzinho de mestrado.

Agradeço a todos os professores que tive durante a minha vida, pois sem eles eu não estaria aqui. Agradeço à professora Sandra e professora Vera do EMEI, aos professores do Colégio Tiradentes da PMMG - JF, em especial à professora Fernanda, professor Anderson, professora Leila e professor Thiago, por todos os ensinamentos que foram além das matérias no quadro. Agradeço à Universidade Federal de Juiz de Fora e aos professores do curso de ciências biológicas, em especial ao professor Carlos Maranduba. Por fim, agradeço ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento e à Universidade Federal de Santa Catarina pela oportunidade de estudar em uma instituição de excelência.

RESUMO

O Vírus da Zika (ZIKV) é uma flavivirose que se tornou uma grande preocupação de saúde pública mundial em 2015 ao ser associado a casos de microcefalia no Brasil. O ZIKV apresenta forte neurotropismo, e, a infecção durante o desenvolvimento leva à redução no volume do córtex cerebral e aumento da espessura e tamanho dos ossos da calota craniana, com o fechamento prematuro das suturas cranianas – craniossinostose. Após buscas por mecanismos moleculares que poderiam ser alvo para o ZIKV e que pudessem explicar tanto a redução do córtex cerebral, quanto as alterações ósseas, a via do Ácido Retinóico (AR) mostrou-se uma potencial candidata. O AR é uma molécula derivada da Vitamina A que age como regulador da formação e alongamento do tubo neural, além de atuar na migração de células da crista neural. Alterações na sinalização de AR podem levar a fenótipos como microcefalia. O AR também pode agir como fator de transcrição ao se ligar em sítios específicos conhecidos como Elementos Responsivos ao AR (ERAR). Dessa forma, o AR pode modular a transcrição de importantes genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial, como Bmp4 e Fgf8. Além disso, as principais variantes do ZIKV associadas à microcefalia são as que possuem maior número de repetições de ERAR. Sendo assim, nossa hipótese é de que ERAR provenientes do genoma do ZIKV desregulam a transcrição de moléculas sinalizadoras que controlam o desenvolvimento craniofacial, levando às alterações congênitas vistas na infecção pelo ZIKV. Para testar esta hipótese, primeiramente analisamos, por RT-qPCR, a expressão de genes envolvidos na síntese (Raldha2, Raldha3) e degradação (Cyp26C1) de AR, em embriões de *Gallus gallus domesticus* (CEUA UFSC – 6016021017) infectados com ZIKV (CIBio/UFSC - CQD101/99). Nossos resultados preliminares indicam que há redução na expressão de Raldha2 e Cyp26C1 e aumento na expressão de Raldha3, Após 24h de infecção. Genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial que são regulados direta ou indiretamente por AR foram analisados, como Fgf8, Shh, Sox9, Sox10, Noggin, Gremlin e Bmp4. Nestes genes verificamos a diminuição na expressão após 24h de infecção, e somente Sox9, Sox10, Bmp4 e Shh tiveram queda na expressão após 48h de infecção. Além disso, o telencéfalo apresentou diminuição de tamanho em E3. Nossos dados sugerem que ERAR provenientes do ZIKV possam competir pela sinalização de AR, levando à queda na expressão de genes-alvo do AR e provocando um efeito em cascata. No entanto, novos testes precisam ser realizados para associar tais alterações da via do AR a um papel central nas malformações craniofaciais observadas na infecção congênita pelo ZIKV.

Palavras-Chave: Desenvolvimento craniofacial; microcefalia; RT-qPCR; *Gallus gallus*.

ABSTRACT

The Zika Virus (ZIKV) is a flavivirus that became a major public health concern worldwide in 2015 when it was associated with cases of microcephaly in Brazil. ZIKV has a strong neurotropism and infection during development leads to a reduction in the volume of the cerebral cortex and an increase in the thickness and size of the bones of the cranial vault, with premature closure of the cranial sutures – craniosynostosis. After searching for molecular mechanisms that could be a target for ZIKV and that could explain both the reduction in the cerebral cortex and the bone changes, the Retinoic Acid (RA) pathway appears to be a potential candidate. AR is a molecule derived from Vitamin A that acts as a regulator of the formation and elongation of the neural tube, in addition to acting in the migration of neural crest cells. Alterations in AR signaling can lead to phenotypes such as microcephaly. AR can also act as a transcription factor by binding to specific sites known as AR Responsive Elements (ERAR). Thus, AR can modulate the transcription of important genes involved in craniofacial development, such as *Bmp4* and *Fgf8*. In addition, the main ZIKV variants associated with microcephaly are those with the highest number of ERAR repeats. Therefore, our hypothesis is that ERAR from the ZIKV genome disrupts the transcription of signaling molecules that control craniofacial development, leading to the congenital changes seen in ZIKV infection. To test this hypothesis, we first analyzed, by RT-qPCR, the expression of genes involved in the synthesis (*Raldha2*, *Raldha3*) and degradation (*Cyp26C1*) of AR, in embryos of *Gallus gallus domesticus* (CEUA UFSC – 6016021017) infected with ZIKV (CIBio /UFSC - CQD101/99). Our preliminary results indicate that there is a reduction in the expression of *Raldha2* and *Cyp26C1* and an increase in the expression of *Raldha3*, after 24h of infection. Genes involved in craniofacial development that are direct or indirectly regulated by AR were analyzed, such as *Fgf8*, *Shh*, *Sox9*, *Sox10*, *Noggin*, *Gremlin*, and *Bmp4*. In these genes, we verified a decrease in expression after 24h of infection, and only *Sox9*, *Sox10*, *Bmp4*, and *Shh* had a decrease in expression after 48h of infection. In addition, the telencephalon showed a decrease in size at E3. Our data let us to suggest that ERAR from ZIKV may compete for AR signaling, leading to a decrease in the expression of AR target genes and causing a cascade effect. However, new tests need to be performed to associate such changes in the AR pathway with a central role in the craniofacial malformations observed in congenital ZIKV infection.

Keywords: Development; microcephaly; RT-qPCR; *Gallus gallus*.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Origem e rota de migração das células da Crista Neural Craniana.....	20
Figura 2 – Principais sinalizações da região neural anterior.....	21
Figura 3 – Bloqueio de Bmp4 por Noggin e Gremlin.....	22
Figura 4 – Via do ácido retinóico.....	23
Figura 5 – Esquema do delineamento experimental.....	27
Figura 6 – Embrião extraído após três dias de incubação.....	28
Figura 7 – Embrião extraído após quatro dias de incubação.....	29
Figura 8 – Infecção dos ovos.....	30
Figura 9 – Distribuição da carga viral normalizada em embriões infectados.....	37
Figura 10 – Vesículas cerebrais dos embriões.	38
Figura 11 – Expressão de Fgf8	41
Figura 12 – Expressão de Shh.....	42
Figura 13 – Expressão de moléculas da via do AR em E3 e E4.	44
Figura 14 – Expressão de Sox9 e Sox10 em E3 e E4.	46
Figura 15 – Expressão de Noggin e Gremlin em E3 e E4.	48
Figura 16 – Expressão de Bmp4 em E3 e E4.....	50
Figura 17 – Hipótese das sinalizações exploradas pelo ZIKV.....	56

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Repetições de ERAR nas diferentes cepas virais do ZIKV.....	24
Tabela 2 – Sequências dos <i>primers</i> usados para análise de expressão gênica.....	31
Tabela 3 – Sequência dos <i>primers</i> usados para ZIKV e sonda FAM.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AB – Arcos Branquiais;

ANR – Anterior Neural Ridge;

AR – Ácido Retinóico;

BM – Broto dos membros;

Bmp – *Bone Morphogenetic Protein*;

CCA – Centro de Ciências Agrárias;

CDC - Centers for Disease Control and Prevention;

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais;

CIBio – Comissão Interna de Biossegurança;

CN – Crista Neural;

CNC – Crista Neural Cefálica;

CO – Coração;

CPN – Célula Progenitora Neural;

CRABP - Cellular retinoic-acid-binding protein;

Cyp26 – Citocromo P450 família 26;

Di – Diencéfalo;

E2 – Dia de desenvolvimento embrionário 2;

E3 – Dia de desenvolvimento embrionário 3;

E4 – Dia de desenvolvimento embrionário 4;

ERAR – Elementos Responsivos ao Ácido Retinóico;

Fig. – Figura;

FIOCRUZ – Fundação Oswaldo Cruz, Paraná;

Fgf – *Fibroblast Growth Factor*;

G. Gallus – *Gallus gallus*;

HH – Hamburger-Hamilton;

ICC – Instituto Carlos Chagas, Fundação Oswaldo Cruz, Paraná;

LACERT – Laboratório de Células Tronco e Regeneração Tecidual;

MRPS27 - *Mitochondrial Ribosomal Protein S27*;

NB2/OGM – Nível de Biossegurança 2 para Organismos Geneticamente Modificados;

OI – Olho;

OPAS – Organização Pan-Americana de Saúde;

PB – Placa basal;

PBS – Tampão Fosfato-Salino;

PFU – *Plaque-Forming Unit*;

Ral – Retinal;

Raldh – Retinoldeído Dehydrogenase;

RBP – *Retinol Binding Protein*;

RDH – *Retinal Dehydrogenase*;

RO – Rombencéfalo;

RT-qPCR – Transcrição Reversa seguida de Reação em Cadeia da Polimerase em tempo real;

Shh – *Sonic Hedgehog*;

SNC – Sistema Nervoso Central;

STRA - *Signaling Receptor and Transporter Of Retinol*;

TE – Telencéfalo;

UFSC – Universidade Federal de Santa Catarina;

VO – Vesícula Ótica;

ZIKV – Vírus da Zika.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	18
1.1	Desenvolvimento craniofacial.....	19
1.2	Ácido Retinóico.....	22
2.0	OBJETIVOS.....	25
2.1	OBJETIVO GERAL.....	25
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	26
3.1	DESENHO EXPERIMENTAL.....	26
3.2	MODELO ANIMAL.....	27
3.2.1	Obtenção dos embriões.....	27
3.3	INFEÇÃO DE EMBRIÕES DE <i>G. gallus</i> COM VÍRUS DA ZIKA.....	29
3.4	ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	30
3.4.1	RT-qPCR.....	31
3.4.1.1	<i>Quantificação Viral.....</i>	<i>32</i>
3.4.1.2	<i>Genes de interesse.....</i>	<i>32</i>
3.5	MEDIDAS DAS VESÍCULAS CEREBRAIS.....	33
3.6	LEVANTAMENTO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA.....	33
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	34
4.0	RESULTADOS.....	35
4.1	O ZIKV INFECTA EMBRIÕES DE <i>G. GALLUS</i>	35

4.2	OS EMBRIÕES INFECTADOS COM ZIKV POSSUEM DIFERENTES CARGAS VIRAIS.....	36
4.2.1	Normalização de carga viral.....	36
4.3	A INFEÇÃO PELO ZIKV DIMINUI O TAMANHO DAS VESÍCULAS CEREBRAIS.....	38
4.4	A INFEÇÃO PELO ZIKV DIMINUI A EXPRESSÃO DE Fgf8 E Shh.....	40
4.4.1	Fgf8.....	40
4.4.2	Sonic Hedgehog.....	41
4.5	A INFEÇÃO PELO ZIKV ALTERA A SINALIZAÇÃO DE ÁCIDO RETINÓICO.....	42
4.6	A INFEÇÃO PELO ZIKV AUMENTA A EXPRESSÃO DE SOX9 E SOX10.....	46
4.7	A INFEÇÃO COM ZIKV ALTERA A EXPRESSÃO NOGGIN E GREMLIN.....	47
4.8	O ZIKV DIMINUI A EXPRESSÃO DE Bmp4.....	49
5.0	DISCUSSÃO.....	51
6	CONCLUSÕES.....	58
7	PERSPECTIVAS.....	58
	REFERÊNCIAS.....	60
	ANEXO A.....	68

1- INTRODUÇÃO

O vírus da Zika (ZIKV) é uma flavivirose (ou seja, seu material genético é RNA de fita simples), transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Foi descoberto por acidente em 1947, em meio a pesquisas sobre o vírus da febre amarela em macacos *Rhesus* na floresta de Zika, em Uganda (Organização Mundial da Saúde - OMS, 2016). O primeiro caso da transmissão do ZIKV a humanos foi registrado em 1952 e, a partir disto, houveram surtos esporádicos na África e na Ásia.

Apenas uma em cada quatro pessoas infectadas pelo ZIKV desenvolvem sintomas que geralmente são leves e consistem em febre baixa, dor de cabeça, dores nas articulações, erupções cutâneas, dores musculares e conjuntivite (Organização Panamericana de Saúde - OPAS, 2017). No entanto, em 2013, o ZIKV foi relacionado à síndrome de Guillain-Barré em jovens e adultos durante uma epidemia na Polinésia Francesa. Esta doença é caracterizada pelo ataque autoimune aos nervos periféricos, porém, até o momento não estão claros os processos celulares e moleculares pelos quais ZIKV interfere e que levam a esta síndrome (Centros de Controle e Prevenção de Doenças - CDC, 2019).

O ZIKV ganhou notoriedade internacional após o surto no Brasil, em 2015, quando foi associado ao aumento nos casos de microcefalia em recém-nascidos. Após os primeiros alertas emitidos pelas entidades sanitárias brasileiras o vírus se espalhou rapidamente por mais de vinte países pelas Américas, se tornando uma preocupação de saúde pública mundial (Heymann *et al.*, 2016). Em 2017 o Brasil concentrava 2386 casos de microcefalia associados à infecção causada pelo ZIKV (86% do total de casos em todo o mundo), seguido por Colômbia com 128 casos (4,6% do total) (Organização Panamericana de Saúde - OPAS, 2017). No início de 2018, haviam cerca de 223,477 casos confirmados da infecção pelo ZIKV por todo o mundo, sendo a maioria situados nas Américas (Organização Pan-Americana de Saúde - OPAS, 2018).

Até o momento os principais achados científicos mostram que ao infectar uma mulher grávida o ZIKV é capaz de atravessar a barreira hematoplacentária e infectar principalmente as células progenitoras neurais (CPN), impedindo a migração e causando a morte destas células (Tang *et al.*, 2016). Alguns trabalhos mostram que o ZIKV é capaz de alterar algumas vias que controlam os principais mecanismos de sobrevivência destas células

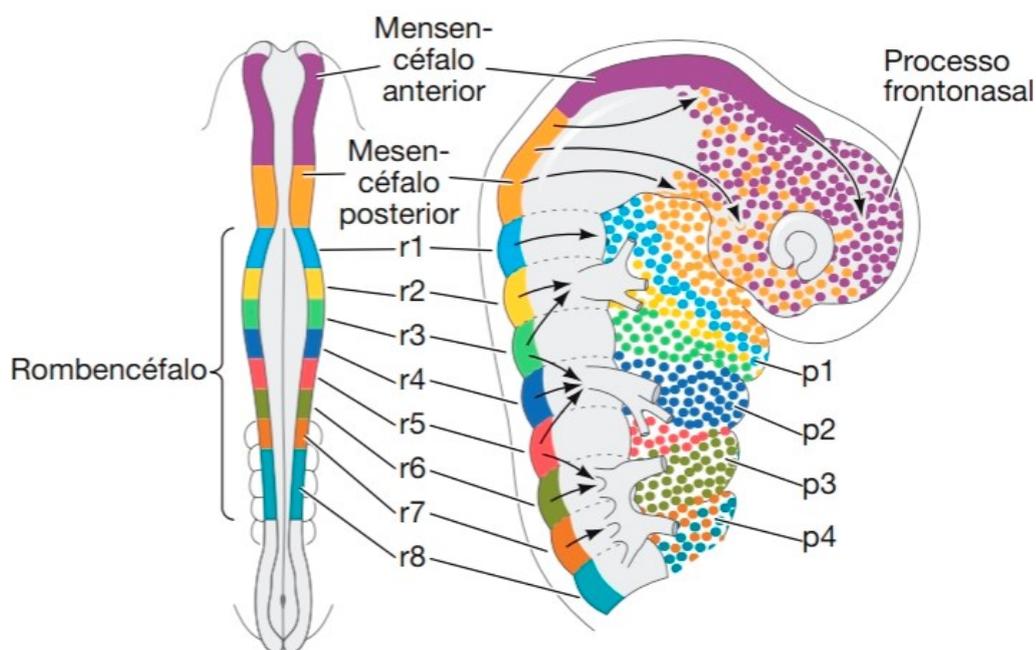
(Wen *et al.*, 2017). No entanto, os mecanismos pelos quais o ZIKV age não são bem compreendidos. Há inúmeras hipóteses acerca do assunto, tal como o desequilíbrio do metabolismo energético nas CPN (PANG *et al.*, 2021), desregulação de genes envolvidos na resposta imunológica, diferenciação celular e apoptose em CPN (LI *et al.*, 2016) e desregulação do ciclo celular (Tang *et al.*, 2016). Porém, é evidente o impacto do ZIKV no desenvolvimento da cabeça.

1.1 – Desenvolvimento craniofacial

A formação das estruturas da face e do crânio possuem origem embrionária comum, e este processo é definido como desenvolvimento craniofacial. Para que este processo ocorra de forma adequada, é necessária uma complexa coordenação entre as células dos tecidos embrionários da região cefálica, com a participação de inúmeras vias de sinalização de forma integrada. A calota craniana não pode mineralizar precocemente e restringir o crescimento cerebral. Para isto, há uma complexa coordenação na sinalização molecular entre o neuroepitélio do telencéfalo (futuro córtex cerebral) e as células da crista neural (CN) cefálica (Douarin; Couly; Creuzet, 2012) (Fig. 1), que formarão os ossos da calota craniana. As células da CN partem das bordas do tubo neural, quando ainda está se fechando (aproximadamente 24h de desenvolvimento no embrião de galinha). Depois que o tubo neural se fecha (aproximadamente 48h de desenvolvimento no embrião de galinha), sofre expansões na região da cabeça formando as vesículas cerebrais.

Figura 1 – Origem e rota de migração das células da Crista Neural Craniana.

As células da crista neural (esferas coloridas) têm origem nas bordas do tubo neural, antes de se fechar. A partir de uma cascata de sinalizações, estas células se desprendem e migram para seu destino final, seguindo sinais químicos (setas). Os locais ocupados por estas células formarão os ossos e cartilagens da cabeça. À esquerda, está representado o tubo neural se fechando, e as cores indicam os locais onde diferentes grupos de células da CN vão partir para colonizar o processo frontonasal e os arcos branquiais, como representado à direita. Rombômeros representados por *r* e arcos branquiais representados por *p*.



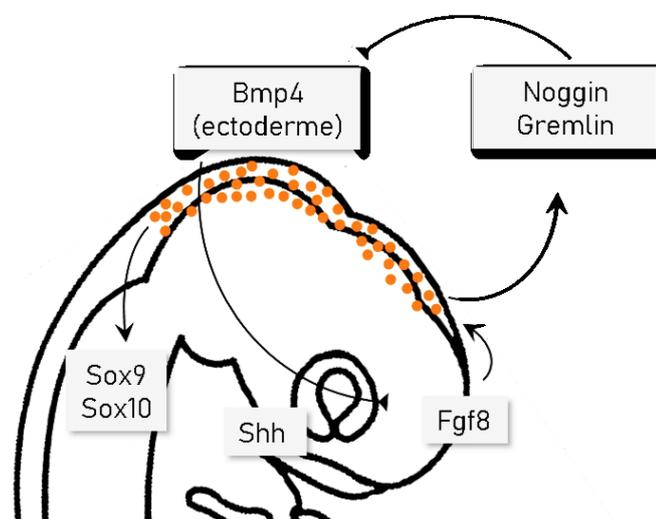
Fonte: adaptado de Gilbert e Barresi, 2019.

Dentre as moléculas que participam do desenvolvimento craniofacial, uma das principais é o Bmp4 produzido pela ectoderme da região cefálica, importante na ossificação da calota (CHEN *et al.*, 1997; CHEN *et al.*, 2020; XU *et al.*, 2007). Além do Bmp4, destacam-se também Fgf8 e Shh (Fig. 2) produzidos pelo neuroepitélio da Região Neural Anterior (ANR) do telencéfalo, que contribuem para a proliferação e diferenciação celular nesta estrutura e nas células da CN que migraram, levando à expansão do processo frontonasal (SCHNEIDER *et al.*, 2001; HU; MARCUCIO, 2009). Bmp4, no entanto, é um potente bloqueador de Fgf8, e, portanto, sua expressão impede o desenvolvimento inicial do telencéfalo. Para que o desenvolvimento possa ocorrer adequadamente, as moléculas Noggin e Gremlin, expressas pelas células da CN cefálica, bloqueiam fisicamente a ação do Bmp4, permitindo que Fgf8 seja expresso (OHKUBO *et al.*, 2002) (Fig. 3). No entanto, mais tarde é necessário que Noggin deixe de ser expresso para que o Bmp4 possa atuar sobre as células da CN cefálica, permitindo o início do processo de ossificação da calota craniana (Creuzet, 2009; Garcez *et al.*, 2014). Importante ressaltar que os mecanismos que levam ao fim da expressão

de Noggin ainda não são conhecidos. Além das moléculas citadas, há ainda Sox9 e Sox10, que são expressas pelas células da CN e podem indicar o estado destas células, que formam o mesênquima craniofacial (MORI-AKIYAMA *et al.*, 2003; MCCAULEY *et al.*, 2008). Posteriormente estas células formarão ossos e cartilagens (a partir da sinalização de Sox9) ou derivados neurais (a partir da sinalização de Sox10).

Figura 2 – Principais sinalizações da região neural anterior.

O desenvolvimento inicial da cabeça acontece por meio de várias sinalizações interconectadas. Bmp4 é expresso na ectoderme e participa da diferenciação óssea na calota craniana, porém inibe Fgf8. No entanto, Fgf8 induz a proliferação e diferenciação das células CN, que por sua vez produzem Noggin e Gremlin, inibindo Bmp4. As células da CN também expressam Sox9 e Sox10, importantes indicadores do estado mesenquimal destas células. Em laranja, as células da CN, dispostas em uma área restrita para melhor visualização do esquema. Setas com ponta plana indicam o bloqueio de função, e setas com ponta triangular indicam o estímulo.

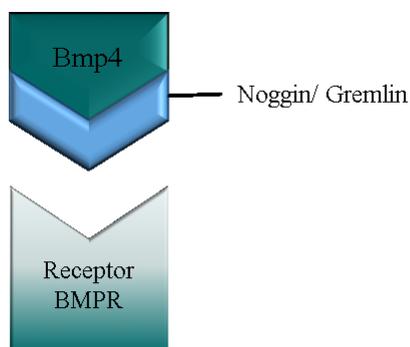


Fonte: Elaborada pela autora.

Em meio às principais alterações associadas à microcefalia induzida pelo ZIKV, se destacam a redução no volume do córtex cerebral e ossificação adiantada da calota craniana - craniossintose (Werner *et al.*, 2016). Se a infecção pelo ZIKV atuar sobre esse eixo de sinalização, poderia explicar de forma coerente ambas as alterações morfológicas. Já foi demonstrado que na infecção pelo ZIKV, a presença de Fgf8 é drasticamente reduzida na placa basal do mesencéfalo e ístmo, regiões do sistema nervoso central (SNC) em desenvolvimento, relativamente afastadas do telencéfalo (futuro córtex cerebral) (Thawani *et al.*, 2018). Esses dados sugerem que, possivelmente, vias de sinalização capazes controlar a expressão de Fgf8 possam ser os alvos primários do ZIKV.

Figura 3 – Bloqueio de Bmp4 por Noggin e Gremlin.

Bmp4 (verde) é bloqueado fisicamente por Noggin e Gremlin (azul). Assim, não há ligação no receptor de Bmp (BMPR - degradê em verde) e transdução dos sinais referentes à via Bmp, ocasionando no desenvolvimento normal do telencéfalo a partir da expressão livre de Fgf8.



Fonte: Elaborado pela autora.

Dentre outras moléculas, o Ácido Retinóico (AR) se destaca por ser capaz de manter a expressão de Fgf8 e Shh nos tecidos neurais em desenvolvimento (SCHNEIDER *et al.*, 2001). O AR controla a ação de genes Hox na região cefálica (Santagati; Rijli, 2003), o que é muito importante pois Hox inibe a expressão de Noggin, impedindo o desenvolvimento do córtex e dos ossos da região cefálica. Como já citado, Noggin bloqueia fisicamente o Bmp4, permitindo que Fgf8 seja expresso e ocorra o desenvolvimento do telencéfalo. Além disso, o AR é um fator determinante para o início e fim da migração das células da crista neural (Reckler; Kalcheim, 2022), participando ativamente do desenvolvimento craniofacial.

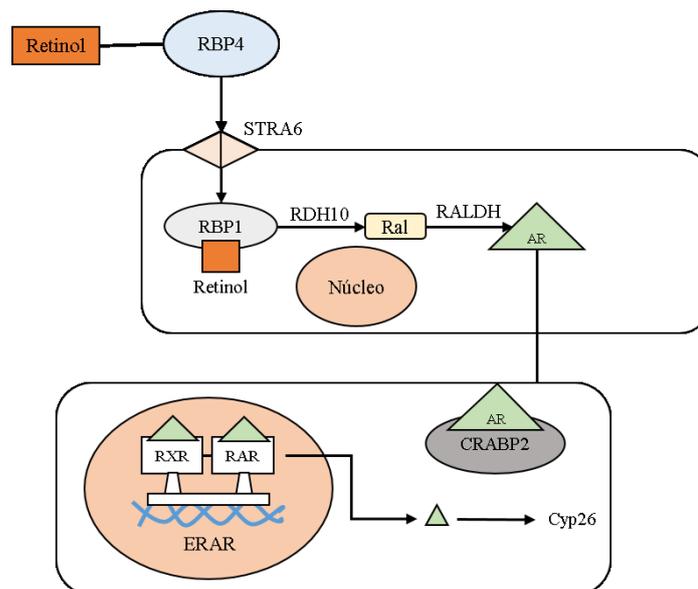
1.2 – Ácido Retinóico

O Ácido Retinóico (AR) é uma molécula derivada da Vitamina A, que é armazenada sob a forma de retinol no fígado e convertida em AR pelas células nas quais será utilizado (RAMALHO, 2010). O AR age como uma molécula sinalizadora que está envolvida no controle do crescimento, diferenciação e padronização neural (Maden, 2007), tendo um papel primordial no desenvolvimento do Sistema Nervoso Central (SNC). Sua quantidade é precisa e qualquer alteração pode afetar o desenvolvimento cerebral e levar a malformações craniofaciais, como por exemplo microagnatia, fenda palatina e microcefalia (GUR *et al.*, 2022; LAMMER *et al.*, 1985; STERN *et al.*, 1954).

O AR, armazenado sob a forma de retinol nos vertebrados, circula pelo organismo com o auxílio da RBP4 (Retinol Binding Protein) (Fig.3). Nas células-alvo que utilizarão o AR, o retinol interage com o receptor de membrana STRA6 (Signaling Receptor And Transporter Of Retinol), e é internalizado. Dentro da célula o retinol circula com o auxílio da RBP1, é convertido a Retinaldeído pela enzima Retinol desidrogenase (RDH10) e em seguida convertido a Ácido Retinóico por enzimas da família retinaldeído desidrogenase (Raldh). Em seguida, o AR pode ser utilizado como sinalização autócrina, ou segue para o núcleo com o auxílio de CRABP2 (Cellular retinoic-acid-binding protein 2). No núcleo, o AR se liga a um heterodímero (molécula de dois domínios de ligação), que muda sua conformação se tornando apto a se ligar em trechos específicos do DNA, chamados de Elementos Responsivos ao AR (ERAR). Com esta ligação, há a regulação transcricional dos genes que possuem ERAR, e o AR segue para degradação por enzimas da família Citocromo P450 subfamília 26 (Cyp26) (Maden, 2007; Rhinn; Dolle, 2012). Importante destacar que as enzimas de síntese e degradação de AR, Raldh e Cyp26, respectivamente, contribuem para o rigoroso controle espacial e de concentração de AR nos tecidos em desenvolvimento. Os transcritos dos genes que possuem ERER em suas regiões promotoras formarão proteínas envolvidas em funções variadas na célula (BALMER; BLOMHOFF, 2002).

Figura 4 – Via do ácido retinóico

A quantidade de AR é regulada de maneira precisa dentro das células, e Raldh e Cyp26, respectivamente enzimas de síntese e degradação, podem auxiliar no monitoramento dos níveis de AR. O AR é sintetizado a partir de Retinaldeído (Ral), e pode ser levado ao núcleo para agir como fator de transcrição de genes que possuem ERAR.



Fonte: Adaptado de Maden, 2007.

Kumar *et al.* (2016), relacionaram *in silico* um maior número de repetições de Elementos Responsivos ao AR (ERAR), presentes no genoma de alguns vírus como citomegalovírus, HIV e herpes vírus à sua alta virulência. Em uma comparação, o ZIKV foi um dos vírus com maiores quantidades de repetições de ERAR, junto com outros vírus que também causam microcefalia. Além disso, curiosamente, dentre as variantes do ZIKV as que possuem maior número de repetições de ERAR são as variantes associadas à microcefalia (Tabela 1). Até o momento, a correlação entre ZIKV, microcefalia e sinalização do AR não foi explorada. Alterações nessa via de sinalização poderiam explicar, de forma unificada, tanto a redução no volume do córtex cerebral, quanto alterações no processo de ossificação da calota craniana.

Tabela 1 – Repetições de ERAR nas diferentes cepas virais do ZIKV

Diversas cepas virais do ZIKV foram listadas quanto à presença de ERAR em seu genoma. Três das cinco variantes listadas que possuem o número máximo de repetições encontrado (4) são associadas à microcefalia. As variantes com quatro repetições de ERAR que não foram associadas à microcefalia possuem poucos estudos a seu respeito.

Cepas do ZIKV	Número de repetições da sequência de ERAR (5' – AGGTCA-3')	Associação com microcefalia
KU497555 (Brasil)	4	Sim
AY632535 (Uganda)	2	Não
EU545988 (Micronésia)	4	Sim
HQ234501 (Senegal)	3	Não
KJ634273 (Ilhas Cook)	0	Não
JN860885 (Camboja)	4	Não
HQ234500 (Nigéria)	2	Não
KJ776791 (Polinésia Francesa)	4	Sim
KF993678 (Tailândia)	4	Não
KF268949 (República Centro-Africana)	2	Não
KU312315 (Suriname)	0	Não

Fonte: Adaptado de Kumar *et al.* 2016.

O AR é envolvido em muitas vias de sinalização do desenvolvimento do Sistema Nervoso e dos ossos da calvária (parte superior do crânio), agindo como um importante fator de transcrição que exerce influência sobre a diferenciação celular. A redução no volume do córtex cerebral e a ossificação avançada (craniosinostose) da calota craniana são as principais alterações morfológicas observadas nos pacientes que apresentam microcefalia induzida pelo ZIKV (Mlakar *et al.*, 2016). O desenvolvimento do córtex cerebral e a ossificação da calota craniana são processos que devem ocorrer de forma altamente coordenada. No entanto, até o

momento não foi demonstrado um mecanismo celular/molecular comum que possa explicar ambas as alterações morfológicas, observadas na microcefalia induzida pelo ZIKV. Alterações na concentração e localização do gradiente de AR podem levar a anormalidades no cérebro e na estrutura craniofacial, sendo a microcefalia um fenótipo resultante da sua deficiência (Rhinn; Dolle, 2012). O AR também é relacionado à sinalização Fgf8, a principal via de sinalização relacionada ao desenvolvimento inicial do córtex cerebral (Corral *et al.*, 2003) e proliferação do mesênquima craniofacial - tecido que formará os ossos cranianos (Creuzet *et al.*, 2004).

Embora os mecanismos ainda sejam desconhecidos, o AR também atua como um importante regulador da osteogênese da calvária, dentre outros ossos, agindo em conjunto com moléculas sinalizadoras para controlar a ação de agentes anti-osteogênicos (Ferguson; Devarajan; Atit, 2018). Além disso, já foi demonstrado que o excesso de AR pode ser relacionado à craniosinostose secundária (ossificação precoce das suturas cranianas) (Laue *et al.*, 2011), fenótipo relacionado à microcefalia. Esta desregulação da ossificação pode estar relacionada com alterações nas proteínas que controlam a síntese e degradação de AR.

A hipótese desse projeto é que o ZIKV poderia alterar o delicado equilíbrio da sinalização do AR durante o desenvolvimento craniofacial, e isso alteraria a sinalização molecular que controla concomitantemente o desenvolvimento do córtex cerebral e a ossificação na calota craniana. Sendo assim, investigar as alterações promovidas pela infecção pelo ZIKV na via de sinalização de AR pode nos guiar a sugerir um novo mecanismo pelo qual o ZIKV poderia induzir a microcefalia, ampliando nosso conhecimento sobre o desenvolvimento craniofacial e, possivelmente permitindo que possíveis métodos para reverter a microcefalia sejam desenvolvidos.

2.0 – OBJETIVOS

2.1 – OBJETIVO GERAL

Analisar se a infecção pelo vírus da Zika modula a via de sinalização do Ácido Retinóico no desenvolvimento craniofacial inicial.

2.2 – OBJETIVOS ESPECÍFICOS

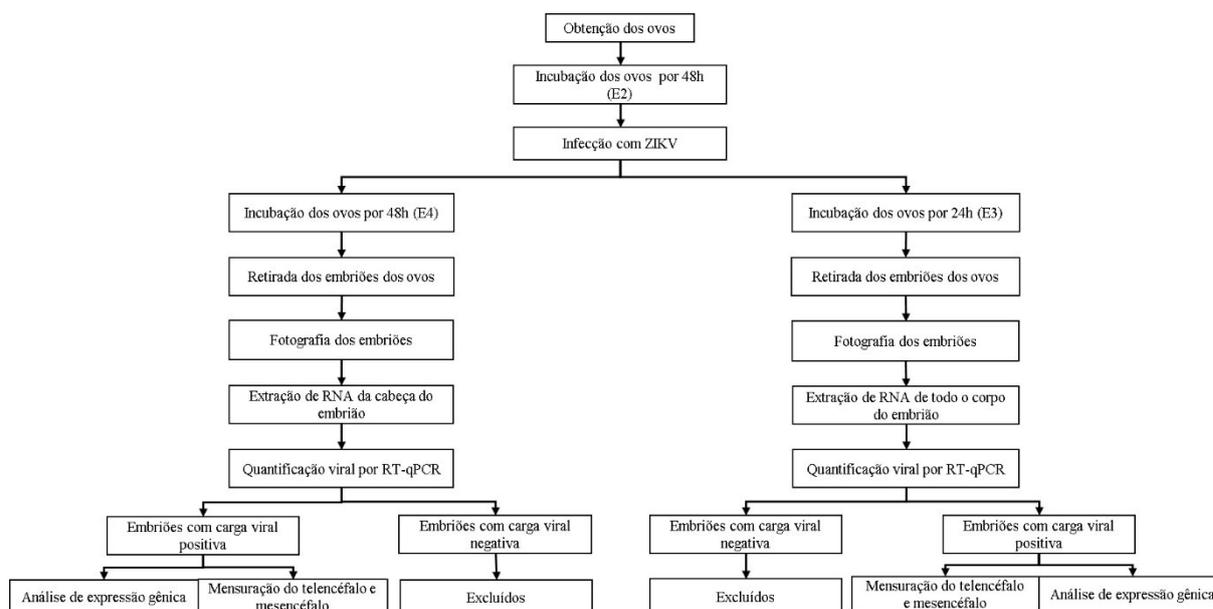
- Analisar a carga viral em embriões de *G. gallus* infectados com ZIKV;
- Determinar o impacto da infecção pelo ZIKV sobre o desenvolvimento inicial do telencéfalo e mesencéfalo;
- Correlacionar a carga viral dos embriões com as alterações no desenvolvimento do telencéfalo e mesencéfalo;
- Avaliar se a infecção pelo ZIKV impacta na expressão de moléculas responsáveis pela síntese e degradação de Ácido Retinóico;
- Verificar se a infecção pelo ZIKV modula a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial, que são influenciados direta ou indiretamente pelo Ácido Retinóico.

3 - MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 – DESENHO EXPERIMENTAL

Dois grupos de experimentos foram conduzidos a partir de ovos infectados após 48h de incubação. Em um grupo de experimentos, os ovos foram incubados por mais 24h após a infecção com ZIKV (até E3), e os embriões tiveram o RNA de todo o corpo extraído. No outro grupo de experimentos, os embriões foram incubados por 48h após a infecção com ZIKV (até E4), e tiveram o RNA da cabeça extraído. Em ambos os experimentos, os embriões foram fotografados logo após serem retirados dos ovos. Após a extração de RNA, foi feita RT-qPCR para diagnóstico e quantificação viral, pois nem todos os embriões infectados são positivos para o ZIKV. A partir disso, os embriões sem ZIKV ou com carga viral muito baixa foram descartados, enquanto os positivos foram submetidos à mais uma RT-qPCR para análise de expressão dos genes alvos deste trabalho, e tiveram suas fotos submetidas à mensuração das vesículas cerebrais mesencéfalo e telencéfalo para posterior correlação com a carga viral.

Figura 5 – Esquema do delineamento experimental



Fonte: Elaborado pela autora.

3.2 – MODELO ANIMAL

Foram utilizados ovos de galinha (*Gallus gallus*) fecundados, coletados no dia da postura, doados pelo Professor Fabiano Dahlke do Laboratório de Avicultura do Centro de Ciências Agrárias (CCA) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Os ovos foram armazenados a 18°C até a utilização nos experimentos, e todos os procedimentos foram aprovados pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA-UFSC), sob protocolo 6016021017.

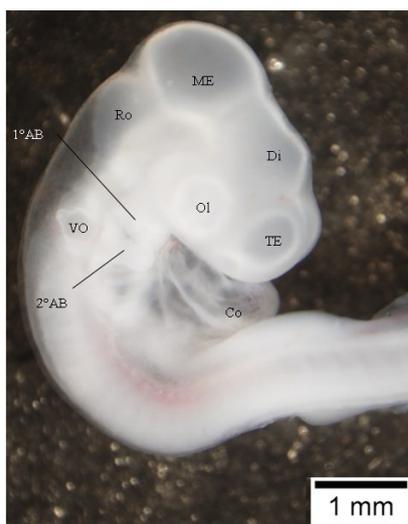
3.2.1 – Obtenção dos embriões

Os ovos foram incubados em chocadeira elétrica automática ChocMais a 38°C e umidade interna a 75%, por 48 horas até o segundo dia de desenvolvimento (E2), com aproximadamente 25 somitos ou HH 14 (HAMBURGER; HAMILTON, 1951). Após este período de incubação inicial, os embriões foram infectados com ZIKV. Esta idade de 48h foi escolhida pois coincide com estágios iniciais da formação das vesículas cerebrais, além de ter

sido previamente padronizada por experimentos do laboratório (BENEVENUTTI, 2022). Após a infecção, os ovos foram devidamente identificados e então incubados por mais 24 horas, até o terceiro dia de desenvolvimento (E3) (Fig. 5), nas mesmas condições.

Figura 6 – Embrião extraído após três dias de incubação

Embrião do grupo controle (sem infecção viral) extraído após três dias de incubação (E3), no qual pode-se observar as principais estruturas abordadas no trabalho: Olho (Ol), telencéfalo (TE), diencéfalo (Di), mesencéfalo (ME), rombencéfalo (Ro), Vesícula ótica (VO), 1º arco branquial (1ºAB), 2º arco branquial (2ºAB) e coração (Co).

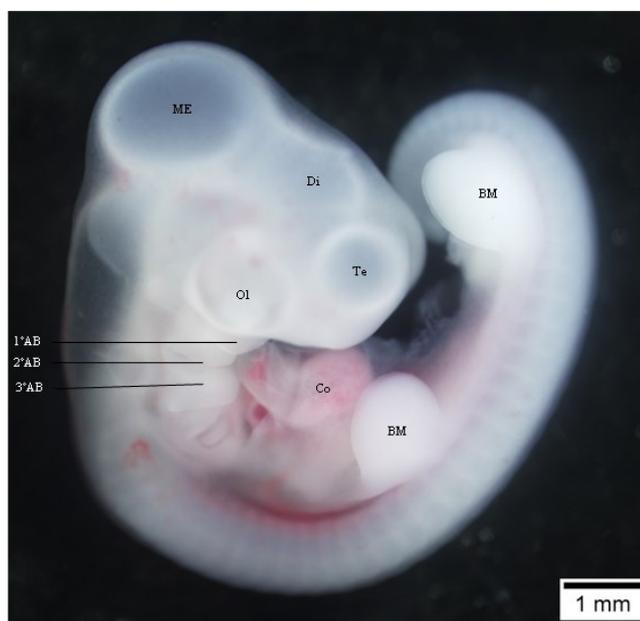


Fonte: Elaborado pela autora.

Os genes analisados em E3 que apresentaram alteração na expressão foram selecionados para análise somente na cabeça. Para isto, os embriões foram incubados sob as mesmas condições anteriormente citadas, por mais 48 horas após a infecção (até E4, ou HH 20) (Fig. 2). Os embriões controles foram submetidos a manipulação semelhante aos infectados, com inoculação de tampão fosfato-salino (PBS) na concentração de 1x.

Figura 7 – Embrião extraído após quatro dias de incubação

Embrião do grupo controle (sem infecção viral) extraído após quatro dias de incubação (E4), no qual pode-se observar as etapas mais avançadas do desenvolvimento. Na imagem: Olho (Ol), telencéfalo (TE), diencéfalo (Di), mesencéfalo (ME), rombencéfalo (Ro), Vesícula ótica (VO), 1º arco branquial (1ºAB), 2º arco branquial (2ºAB), 3º arco branquial (3ºAB), coração (Co) e brotos dos membros (BM).



Fonte: Elaborado pela autora.

3.3 - INFECÇÃO DE EMBRIÕES DE *G. gallus* COM VÍRUS DA ZIKA

Foi utilizada a cepa do vírus da Zika 15261, isolada a partir de gestante infectada cujo feto apresentou microcefalia, e obtida em parceria com o Instituto Carlos Chagas / Fundação Oswaldo Cruz – Paraná (ICC – Fiocruz PR). As etapas que abrangem manipulação do ZIKV foram realizadas em sistema de contenção em sala NB2/OGM certificada pelo CIBio/UFSC (CQD101/99). O vírus foi utilizado em concentração de 500 e 1000 PFU (Unidades formadoras de placa – *Plaque Forming Unit*), que consiste no total de partículas virais ativas. Esta etapa foi previamente padronizada em experimentos do laboratório (BENEVENUTTI, 2022). Foram realizados 28 grupos de infecção, cada um composto por 20 embriões, sendo três grupos experimentais: cinco controles; dez infectados com 500 PFU e cinco infectados com 1000 PFU. Os procedimentos de infecção foram realizados de forma independente.

A infecção foi realizada em capela de fluxo laminar equipada com filtro HEPA, com auxílio de microscópio estereoscópico (Olympus SZ61). Os ovos foram abertos na região da

câmara de ar e a membrana externa foi removida com auxílio de materiais cirúrgicos (tesoura e pinça), para dar acesso ao embrião. A membrana interna foi cortada na região próxima à cabeça (Fig. 7B), e com uma micropipeta, 1ul da solução viral foi inoculada nas proximidades da região cefálica do embrião (Fig. 7C). Após a infecção os ovos foram devidamente identificados e tiveram a abertura da casca vedada com fita adesiva transparente atóxica, retornando para a incubação a 38°C graus com umidade interna a 75%.

Figura 8 – Infecção dos ovos

A partir do ovo inteiro (A), é feita uma abertura na região inferior, onde está a câmara de ar, para ter acesso ao embrião. A membrana externa é retirada, e a membrana interna é cortada na região próxima à cabeça (B). A partir deste corte, a solução viral é inoculada com o auxílio de uma micropipeta (C).



Fonte: Elaborado pela autora.

3.4 - ANÁLISE DE EXPRESSÃO GÊNICA

As análises de expressão de genes da via do AR e de genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial que possuem ERAR em seus *enhancers* foram realizadas por RT-PCR em tempo real (RT-qPCR), em embriões infectados com ZIKV. Os genes selecionados são associados à síntese e degradação de Ácido Retinóico – Raldh e Cyp26 respectivamente, e envolvidos no desenvolvimento craniofacial que possuem ERAR em suas regiões promotoras: Fgf8 e Shh relacionados ao desenvolvimento do telencéfalo e Sox9, Sox10, Bmp4 e Noggin relacionados à ossificação e formação de cartilagens da cabeça. Além disso, todos os embriões inoculados com ZIKV foram testados quanto a infecção pelo ZIKV, por RT-PCR em tempo real, tendo sua carga viral quantificada.

3.4.1 - RT-qPCR

O processo para a RT-qPCR, para quantificação viral e para análise de expressão dos genes de interesse, foi dividida em três etapas. Para a primeira etapa, foi realizada a extração do RNA total dos embriões em E3 e E4, utilizando Qiagen RNeasy Mini Kit (Qiagen), conforme orientações do fabricante. Em seguida, foi realizada a quantificação do RNA extraído por espectrofotometria de UV/Vis (Picodrop Microliter UV/Vis Spectrophotometer). Após, foi realizada a RTqPCR (QuantStudio3 - Thermo) utilizando o kit GoTaq® 1-Step RT-qPCR System (Promega), conforme orientações do fabricante; o RNA previamente diluído a 10ng/ul; e *primers*, específicos para os transcritos de interesse (tabela 2). A análise de expressão foi determinada em relação ao controle, utilizando o gene *Mrps-27* como *housekeeping* (previamente padronizado).

Tabela 2 – Sequências dos *primers* usados para análise de expressão gênica

Primers sense (S) ou forward e anti-sense (AS) ou reverse, utilizados para análise de expressão gênica.

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' - 3')
Fgf8 S	GAGACCGACACCTTTGGGAG
Fgf8 AS	TTGCCGTTACTCTTGCCGAT
Shh S	AGAGAACACGGGAGCTGACAGA
Shh AS	CCGGGCCACTGGTTCATCAC
RaldhA2 S	GGCACGGCATGGCACGATTTTTA
RaldhA2 AS	CTGCTCTCTGTTGCTGGATT
RaldhA3 S	TCGGAGGCAAAAACCCCTGC
RaldhA3 AS	GTGCAGCACTGCCCTGATT
Cyp26C1 S	TCCGTGACACACATGAGACG
Cyp26C1 AS	GGGATGTAGTGGAAGCGACC
Sox9 S	CGAAGGAAGCTGGCTGACCA
Sox9 AS	GAAGGGACGCTTCTCGCTCT
Sox10 S	TGCAGCCTTCACAGGGTTTG
Sox10 AS	AGGTGCGAAGAGTTGTCCGA
Noggin S	GCTTTTGCCCCGGTACGTC
Noggin AS	ACCGCCACCTCAGGATCGTT
Gremlin S	ATCCCCAGGCATGTCCGCAA
Gremlin AS	AGCTCAGGGCAGTTGAGGGT
Bmp4 S	CGCGCTGGCTCTCCAGAATC
Bmp4 AS	CCTCCCAGCAGGACTTGCA

Fonte: Elaborado pela autora.

3.4.1.1 - Quantificação Viral

Para o diagnóstico dos embriões quanto à presença do ZIKV, foi realizada RT-qPCR, no padrão já descrito, utilizando o kit GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System (Promega) os *primers* citados na tabela 2 e com acréscimo de sonda fluorescente FAM, como descrito por Lanciotti *et al.* (2008). Estes materiais foram doados pelo Instituto Carlos Chagas/ Fiocruz Paraná. As amostras que não amplificaram foram consideradas negativas, e descartadas. Visando sua quantificação viral, as amostras positivas tiveram sua amplificação (Cq) comparados com uma curva de diluição seriada de uma amostra de RNA positiva para ZIKV, previamente quantificada (doada pelo Prof. Dr. Daniel Mansur). Dessa forma foi obtida uma quantificação viral relativa. Com base nesses dados foi calculada a carga viral total de cada embrião. Nessa idade, os embriões apresentam uma variação de tamanho relativamente grande, então, afim de normalizar a carga viral, essa foi dividida pela quantidade de RNA total extraído, obtendo assim a carga viral normalizada para cada embrião.

Tabela 3 – Sequência dos *primers* usados para ZIKV e sonda FAM

PRIMER	SEQUÊNCIA (5' → 3')
ZIKV 1086	CCGCTGCCCAACACAAG
ZIKV 1162C	CCACTAACGTTCTTTTGCAGACAT
ZIKV 1107 - FAM	AGCCTACCTTGACAAGCAGTCAGACACTCAA

Fonte: Adaptada de Lanciotti *et al.* (2008).

3.4.1.2 – Genes de interesse

Os *primers* dos genes analisados (Raldha2, Raldha3, Cyp26C1, Sox9, Sox10, Noggin, Gremlin e Bmp4) foram desenhados no *software online* Primer3Plus, e validados pelo *primer* BLAST, ambos do National Center for Biotechnology Information (NCBI). A RT-qPCR foi realizada, conforme descrito acima, com uso de corante fluorescente BRYT Green (que possui propriedades similares ao corante SYBR Green I: excitação a 493 nm e emissão em 530 nm) para detecção do amplicon. Os *primers* também foram testados quanto à sua eficiência e especificidade. Os níveis de expressão para cada embrião foram estipulados utilizando o cálculo para quantificação relativa Pfaffl (PFAFFL, 2001). Nesta fórmula, a expressão relativa do gene para cada amostra é calculada a partir da divisão da eficiência do *primer* do gene alvo (E_{alvo}) (indicada pelo software Design & Analysis 2.6 - Thermo Fisher Scientific), pela eficiência do *primer* para o gene de referência, Mrps-27 (E_{ref}), elevados pelos seus respectivos ΔCq .

$$\text{Expressão relativa} = \frac{(E_{alvo})^{\Delta Cq_{alvo}}}{(E_{ref})^{\Delta Cq_{ref}}}$$

3.5 – MEDIDAS DAS VESÍCULAS CEREBRAIS

A medida das vesículas encefálicas foi realizada com o auxílio do *software* ImageJ versão 1.38e. Para isto, todos os embriões foram fotografados com microscópio estereoscópico Olympus SZX2- ILLB, nos lados direito e esquerdo, todos rigorosamente no mesmo aumento. Todas as medidas foram realizadas em ambos os lados. As medidas das vesículas cerebrais foram normalizadas pelo tamanho das vesículas óticas dos respectivos embriões. A vesícula ótica foi selecionada para normalizar as análises do SNC, pois existe variações naturais no tamanho dos embriões. Para validar a vesícula ótica como uma estrutura normalizadora, essa estrutura foi medida em todos os embriões controles e infectados e esses foram analisados estatisticamente. Não foi observado diferença nas medidas das vesículas óticas entre controles e infectados (Anexo A). Ou seja, o desenvolvimento da vesícula ótica não é afetado pelo ZIKV na idade que analisamos os embriões.

3.6 – LEVANTAMENTO DO PADRÃO DE EXPRESSÃO GÊNICA

Para a construção dos mapas de expressão dos genes analisados, foi feito um levantamento no *Gallus Expression In Situ Hybridization Analysis* (GEISHA) – *University of Arizona*, uma base de dados com imagens de Hibridização *In Situ* (HIS) em *G. gallus*, em variados estágios do desenvolvimento. O levantamento dos padrões de expressão gênica também auxiliou na determinação dos genes da via do AR a serem analisados. No caso, existem três enzimas relacionadas à síntese de AR (Raldha1, Raldha2 e Ralgha3), e três relacionadas à degradação (Cyp26A1, Cyp26B1 e Cyp26C1). Com base nas análises feitas no GEISHA, foram selecionados Raldha2, Raldha3 e Cyp26C1, pois são expressos próximo à região do processo frontonasal, relacionado ao desenvolvimento craniofacial inicial.

3.7 – ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas no *software* GraphPad Prism 9.0.2. Para as análises de comparação entre controles e tratados foi utilizado o teste T não paramétrico com amostras não pareadas Mann-Whitney. Já para análises com mais de dois grupos, como por exemplo comparações entre controles e infectados com 500PFU e 1000PFU, foi utilizando o teste não-paramétrico Kruscal-Wallis de uma via e pós-teste de Dunn. Em todas as análises, as amostras foram previamente testadas quanto a normalidade com o teste Shapiro-Wilk. Nas análises de correlação, foi utilizado o teste de correlação não-paramétrico de Spearman, com p-valor bicaudal seguido de regressão linear simples. Em todos os testes os resultados com valor de $p < 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

4.0 - RESULTADOS

Considerando que a dinâmica espaço-temporal entre AR e demais genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial é controlada de maneira precisa e possui papel fundamental no desenvolvimento inicial do córtex cerebral e dos ossos da calota craniana, hipotetizamos que os ERAR provenientes do genoma do ZIKV podem perturbar esta interatividade. Assim, investigamos a influência do ZIKV sobre o desenvolvimento do telencéfalo e mesencéfalo embrionários e sobre a expressão de genes envolvidos na via de produção/degradação do AR. Além disso, analisamos genes que controlam o desenvolvimento craniofacial que possuem ERAR em seus *enhancers*.

4.1 – O ZIKV INFECTA EMBRIÕES DE *G. GALLUS*

O método de infecção realizado em todos os experimentos foi previamente padronizado por Benevenuti (2022). É um método não invasivo, que permite a continuidade do desenvolvimento do embrião. Os embriões foram incubados e infectados após 48h de desenvolvimento (embriões com aproximadamente 25 pares de somitos), e então incubados por mais 24h (até E3) ou 48h (até E4) a depender do grupo experimental a qual pertenceram. Depois desse período, os embriões foram retirados dos ovos e seguiram para a extração e quantificação do RNA. Em seguida, foi realizado o diagnóstico quanto à presença de ZIKV e quantificação viral, por RT-PCR. Como referência para quantificação da carga viral, foi utilizada uma curva de RNA total com concentrações conhecidas de ZIKV. No total, 154 embriões foram inoculados com ZIKV, dos quais 83 foram considerados positivos. Estes dados mostram que a taxa de infecção obtida em nossos experimentos foi de 53,89%. Os embriões que apresentaram uma carga viral muito baixa (Cq acima de 38 no RT-PCR), foram desconsiderados das análises seguintes, resultando no total de 72 embriões, oriundos de 20 procedimentos de infecção, realizados de forma independente.

Dos experimentos conduzidos com embriões em E3, foram realizados 14 grupos, totalizando 63 embriões controles (com 16 mortos, representando 25,4% do total), 123 infectados com 500 PFU (com 16 mortos - 13%) e 59 infectados com 1000 PFU (com 12 mortos - 20,33%). Já nos experimentos conduzidos com embriões em E4, foram 6 grupos,

totalizando 26 embriões controles (com 6 mortos - 23,07%) e 99 infectados com 500 PFU (com 17 mortos - 17,17%).

4.2 – OS EMBRIÕES INFECTADOS COM ZIKV POSSUEM DIFERENTES CARGAS VIRAIS

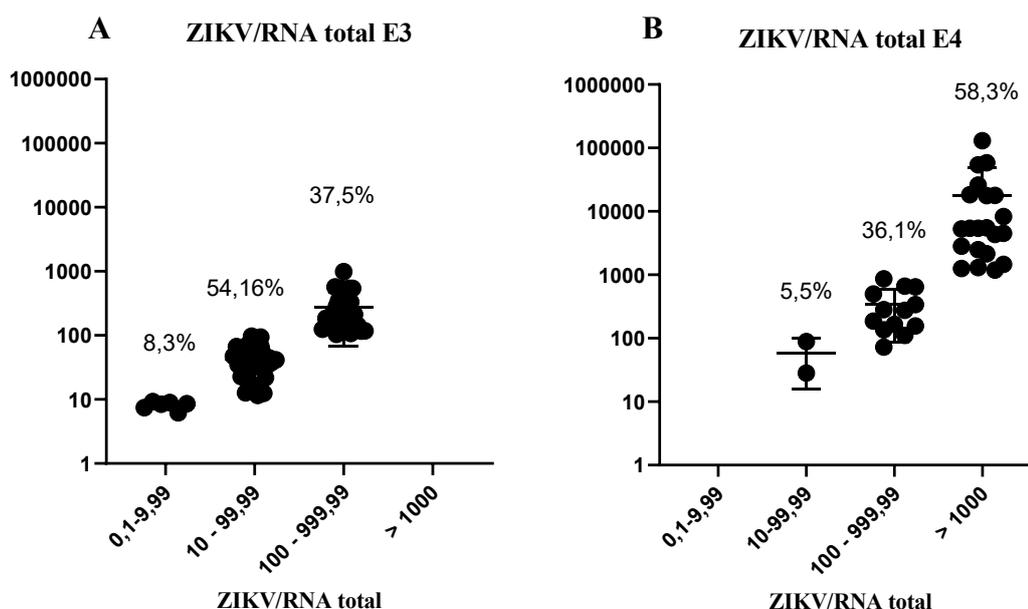
4.2.1 – Normalização de carga viral

Inicialmente, observamos que os embriões possuem variações naturais em seus tamanhos, e que isso reflete na quantidade de RNA extraído, já que este fator é diretamente relacionado à quantidade de células do embrião. Ao realizar a quantificação viral, obtivemos a carga viral total do embrião. Esse dado não leva em conta a pluralidade de tamanhos dos embriões. Por exemplo, uma amostra que apresentou menor carga viral total pode ser de um embrião menor, com menos células, o que reflete uma relação de quantidade de vírus por células não tão baixa. Sendo assim, para as análises posteriores a carga viral de cada embrião foi normalizada em relação ao RNA total extraído.

A normalização foi feita a partir da divisão da carga viral total pela quantidade total de RNA extraído de cada embrião. Estipulamos a distribuição de carga viral normalizada em faixas, para demonstrar a heterogeneidade da carga viral nos embriões inoculados com ZIKV (Fig. 8).

Figura 9 – Distribuição da carga viral normalizada em embriões infectados

Carga viral normalizada calculada pela divisão da carga viral absoluta pela quantidade de RNA total extraída. Os embriões que obtiveram Cq abaixo de 38 foram distribuídos em faixas quanto à quantidade relativa de ZIKV, a fim de demonstrar a heterogeneidade na carga viral. Cada faixa possui a porcentagem de embriões correspondentes na população total. (A) Distribuição das faixas virais em E3. N = 73 (B) Distribuição das faixas virais em E4. N = 36.



Fonte: Elaborado pela autora.

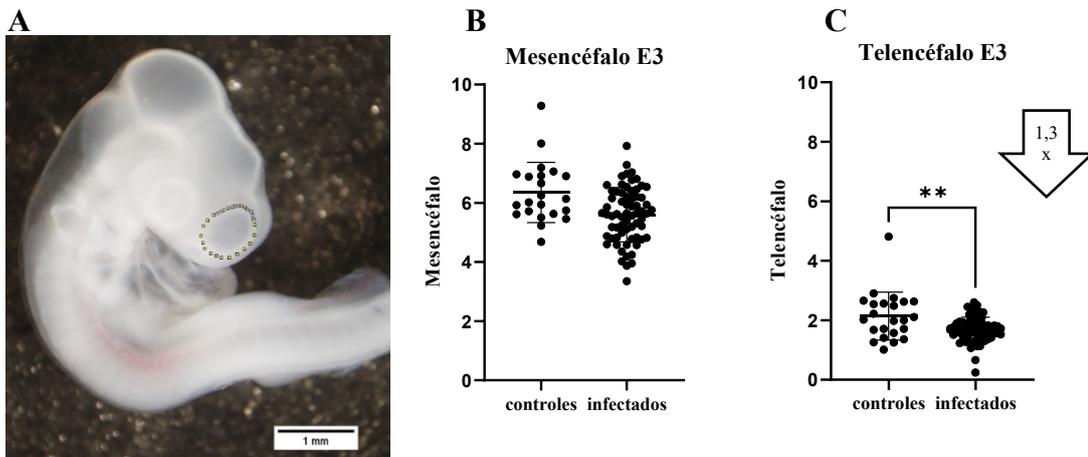
Estes resultados mostram uma variação importante na quantidade de ZIKV entre os embriões, e um aumento exponencial da carga viral nos diferentes períodos de incubação. Além disso, é possível observar que os embriões que ficaram dois dias na presença do ZIKV (Fig. 8B) apresentam maior carga viral. Importante destacar que esse é o primeiro trabalho científico que analisa dados de infecção de embriões com ZIKV, levando em consideração a variação da carga viral. Esses resultados permitem avaliar com precisão as diferentes respostas do embrião, frente às diferentes concentrações do ZIKV no modelo estudado. Além disso, permitem analisar se as alterações genéticas, e consequentemente, morfológicas podem ser relacionadas com a carga viral.

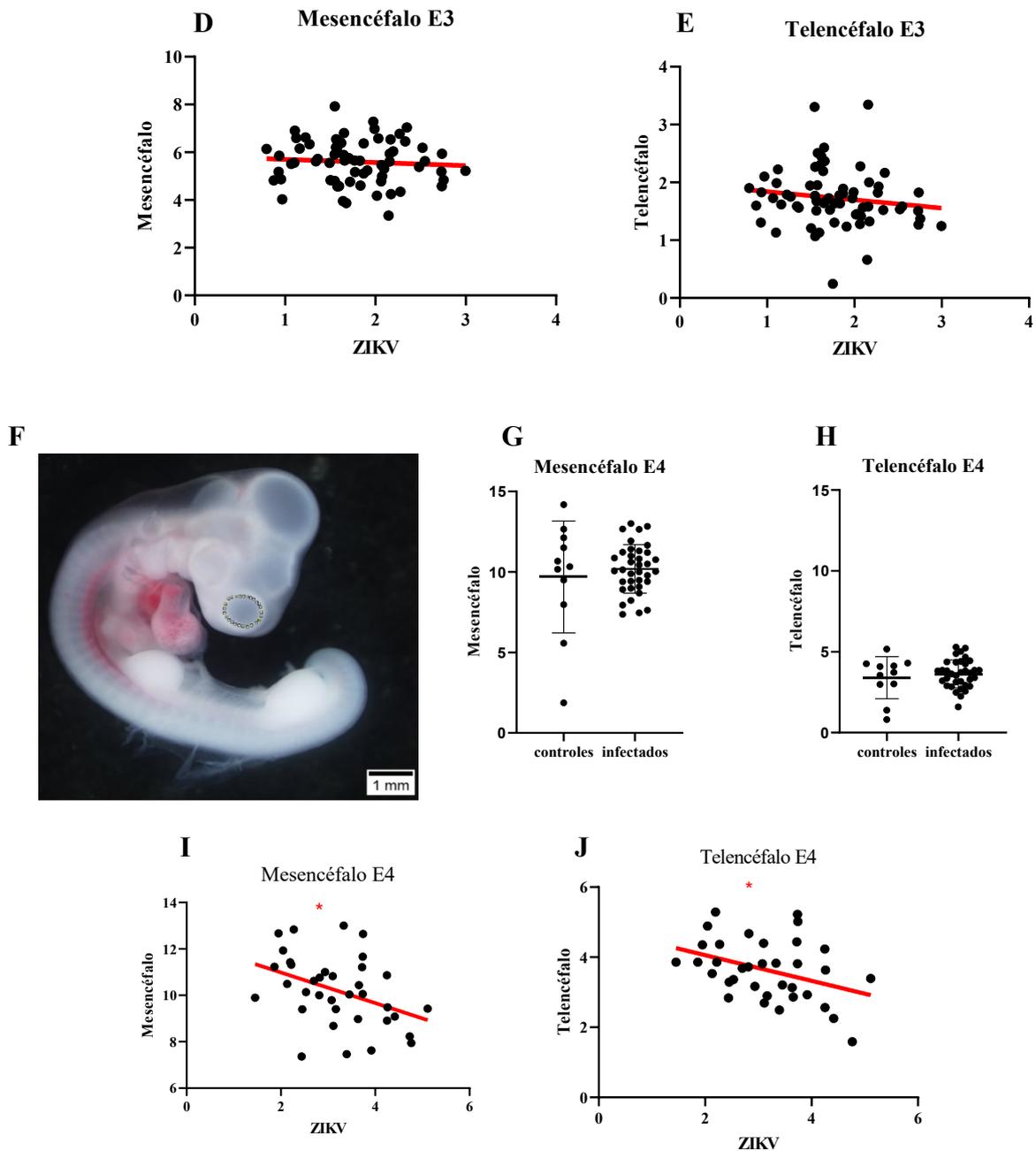
4.3 – A INFECÇÃO PELO ZIKV DIMINUI O TAMANHO DAS VESÍCULAS CEREBRAIS

Levando em consideração que uma das principais características relacionadas à microcefalia induzida pelo ZIKV é a redução do córtex cerebral, foi realizada a medida das vesículas cerebrais, telencéfalo (futuro córtex cerebral) e mesencéfalo (Figura 9 B – J), seguida da comparação entre controles e infectados. Respeitando as variações naturais de tamanho em cada embrião e visando a precisão nas mensurações, foram utilizadas as medidas das vesículas óticas dos respectivos embriões para normalização, pois é uma vesícula fácil de medir e, nas nossas análises, essa vesícula não apresenta variação significativa entre embriões controles e infectados com o ZIKV (Anexo A). Das vesículas cerebrais analisadas, somente mesencéfalo (Fig. 9I) e telencéfalo em E4 (Fig. 9J) apresentaram correlação negativa com ZIKV, ou seja, quanto maior a carga viral, menor o tamanho destas vesículas. No entanto, apenas os telencéfalos em E3 tiveram diferença estatística entre controles e infectados, com queda de 1,3x na média de tamanhos (Fig. 9D).

Figura 10 – Vesículas cerebrais dos embriões.

Embriões em E3 (A) e E4 (F) com telencéfalos circulado. Comparação das médias dos mesencéfalos (B, G) e telencéfalos (C, H) entre embriões controles e infectados. Somente houve variação significativa nas medidas dos telencéfalos em E3 (C) ($p=0,0077$). Em E4, não houve diferença significativa entre as medidas de ambas as vesículas (G, H). Gráficos de correlação entre carga viral (eixo X) e tamanho das vesículas (eixo Y) em E3 (D, E) e E4 (I, J). A reta em vermelho indica a queda progressiva no tamanho das vesículas. Somente os mesencéfalos (I) e telencéfalos (J) de E4 apresentaram correlação com carga viral. (I) $p = 0,0125$. (J) $0,0325$. $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação. Embriões em E3 N = 95 (72 infectados com ZIKV e 23 controles); embriões em E4 N = 47 (36 infectados com ZIKV e 11 controles).





Fonte: Elaborado pela autora.

Com base nestes dados de variação dos tamanhos das vesículas cerebrais podemos concluir que a infecção pelo ZIKV influencia na expansão inicial do telencéfalo, vesícula que formará o futuro córtex cerebral. Curiosamente, esse efeito não é observado em E4, e em parte isso pode ocorrer pela dificuldade em realizar essas medidas em embriões maiores. A partir disto, seguimos para análise de moléculas envolvidas no desenvolvimento do telencéfalo.

4.4 – A INFECÇÃO PELO ZIKV DIMINUI A EXPRESSÃO DE Fgf8 E Shh

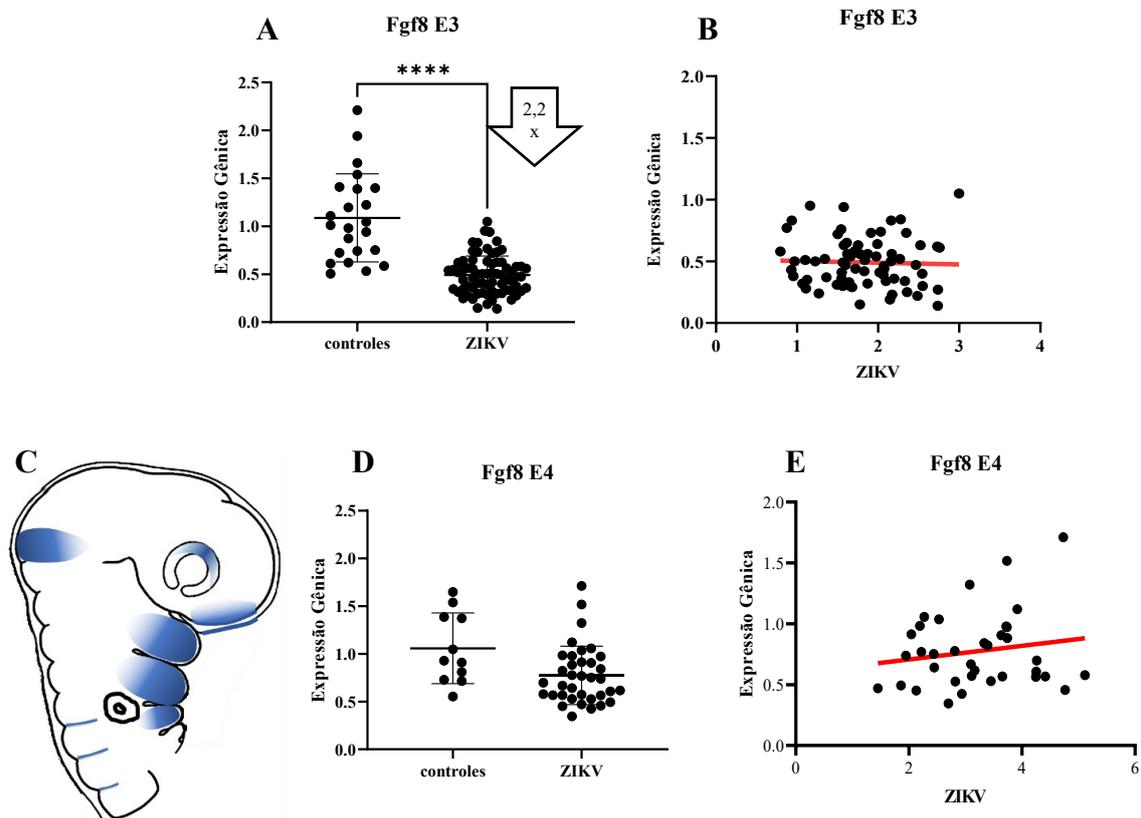
Fgf8 e Shh são importantes moléculas sinalizadoras que estimulam a proliferação e diferenciação celular do telencéfalo (futuro córtex cerebral). Alterações na expressão destas moléculas podem levar a defeitos durante o desenvolvimento craniofacial (CROSSLEY *et al.*, 2001). Considerando que a microcefalia induzida pelo ZIKV pode levar à redução do tamanho do córtex cerebral, estas moléculas podem ter um papel importante nestas alterações. Além disso, considerando nossas análises de morfológicas, que indicam que o ZIKV provoca a diminuição do telencéfalo em E3, analisamos a expressão destas duas moléculas. Para a análise dos efeitos da infecção pelo ZIKV sobre a expressão de Fgf8 e Shh, dois experimentos foram conduzidos: em ambos, os embriões (E2) foram inoculados com o ZIKV. Após 48h de incubação, o primeiro grupo teve o RNA de todo o corpo extraído e analisado. O segundo grupo teve o RNA da cabeça extraído e analisado, após 48h da inoculação do ZIKV (E4).

4.4.1 – Fgf8

Em nossas análises de embriões em E3, detectamos queda de 2,21x na expressão de Fgf8 em embriões infectados com ZIKV (Fig. 10A). Em seguida, para verificar se a redução na expressão de Fgf8 estava correlacionada à carga viral do embrião, realizamos o teste não-paramétrico de correlação de postos de Spearman, e verificamos que não houve correlação negativa em relação ao ZIKV, ou seja, a expressão de Fgf8 não diminui à medida que a carga viral aumenta (Fig. 10B). Em E4, as análises não apresentaram diferença significativa na expressão de Fgf8 (Fig. 10D-E).

Figura 11 – Expressão de Fgf8

(A) Comparação nos níveis de expressão em embriões controles e infectados com ZIKV em E3. No eixo X ($p < 0,0001$). (B) Gráfico de correlação entre carga viral (eixo X) e expressão gênica (eixo Y) em E3. Sem diferença significativa na expressão de Fgf8. ($p = 0,5878$). (C) Em azul, locais de expressão de Fgf8 na cabeça de embrião com idade aproximada de E3: olho, istmo, ectoderme do processo frontonasal, placóides nasais, arcos faríngeos, somitos. (D) Comparação nos níveis de expressão em embriões controles e infectados com ZIKV em E4. Sem diferença significativa. (E) Gráfico de correlação entre carga viral (eixo X) e expressão gênica (eixo Y) em E4. Sem diferença significativa ($p = 5431$). $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação.



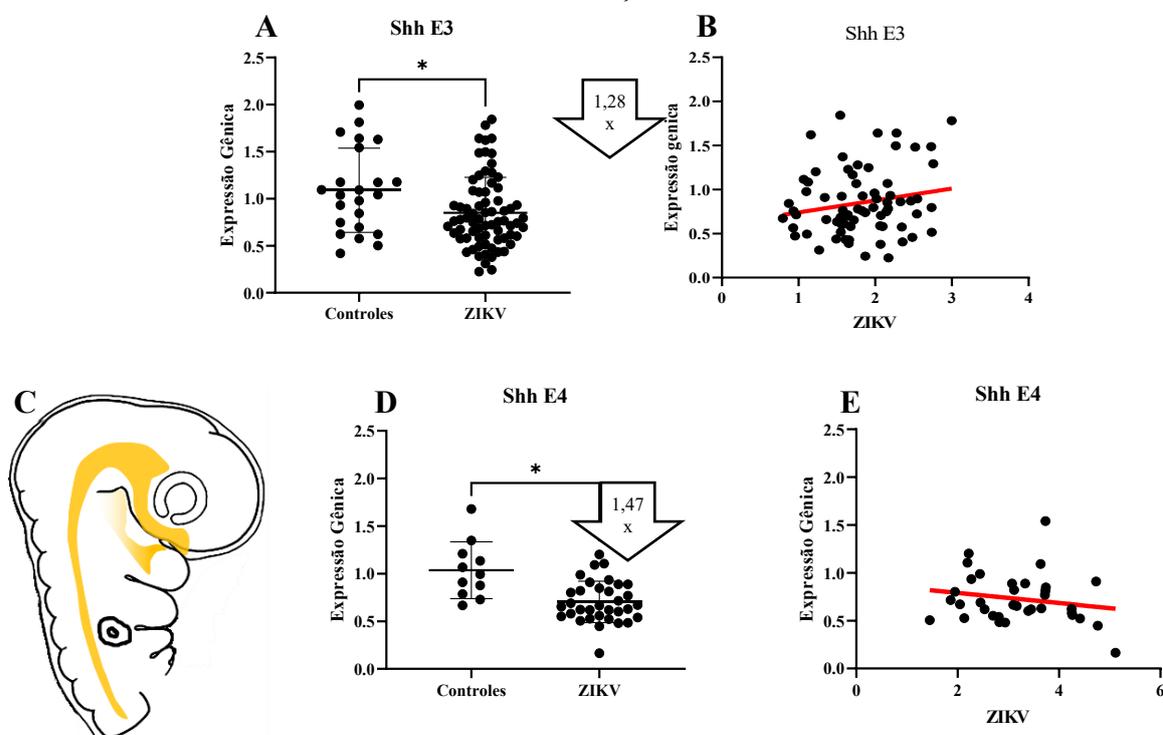
Fonte: Elaborado pela autora.

4.4.2 – Sonic Hedgehog

Shh apresentou queda de 1,28x na sua expressão em E3 (Fig. 11A), e queda de 1,47x em E4 (Fig. 11D). Não houve correlação negativa em relação ao vírus em nenhum dos períodos analisados (Fig. 11B, E), ou seja, a diminuição na expressão de Shh nestes embriões não está relacionada diretamente à carga viral. Os principais locais de expressão de Shh na cabeça, destacados na figura 11C, são notocorda, placa pré-cordal, primeiro arco branquial e assoalho do tubo neural.

Figura 12 – Expressão de Shh

(A) Comparação entre expressão de Shh em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p = 0,0303$); (B) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3, sem variação ; (C) Em amarelo, locais de expressão de Shh na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (D) Comparação entre expressão de Shh em embriões controles e infectados com ZIKV em E4 ($p = 0,0190$); (E) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4, sem correlação. $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Estes resultados mostram que fatores de crescimento classicamente relacionados ao desenvolvimento inicial do telencéfalo são perturbadas no início da infecção pelo ZIKV. Como citado anteriormente, o ácido retinóico possui um papel importante no desenvolvimento do telencéfalo, e alterações nos seus níveis poderiam contribuir para a diminuição na expressão de Fgf8 e Shh. Sendo assim, o passo seguinte deste trabalho foi analisar as moléculas da via de sinalização de AR.

4.5 – A INFECÇÃO PELO ZIKV ALTERA A SINALIZAÇÃO DE ÁCIDO RETINÓICO

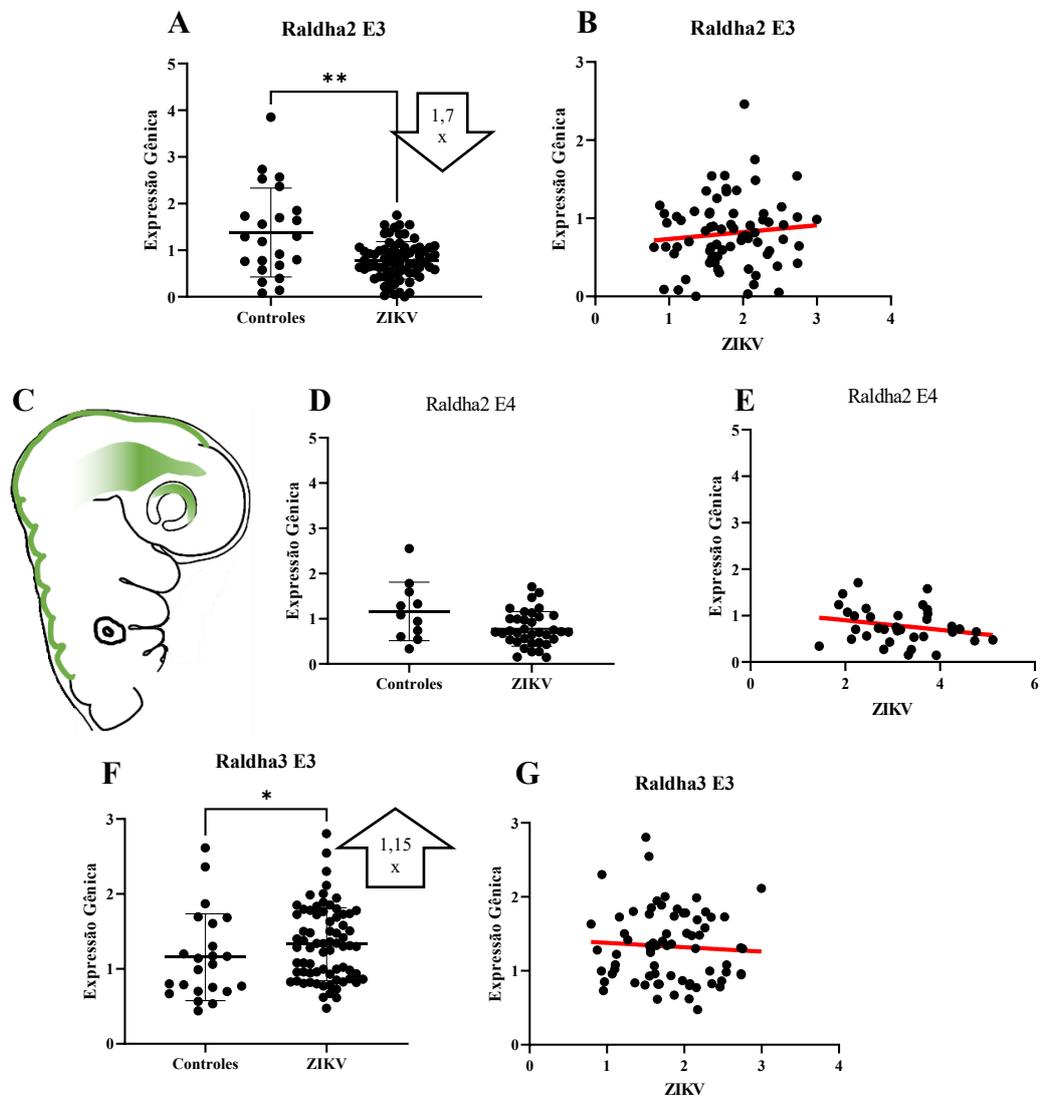
Os níveis de AR são controlados de maneira precisa nas células, e com isso, a expressão das moléculas de síntese e degradação de AR podem ser utilizadas como indicadores dos níveis de AR nas células. Sendo assim, utilizamos o corpo de embriões em E3 (infectados após 48h de incubação, e incubados por mais 24h após infecção com ZIKV) e a cabeça de embriões em E4 (infectados após 48h de incubação, e incubados por mais 48h após

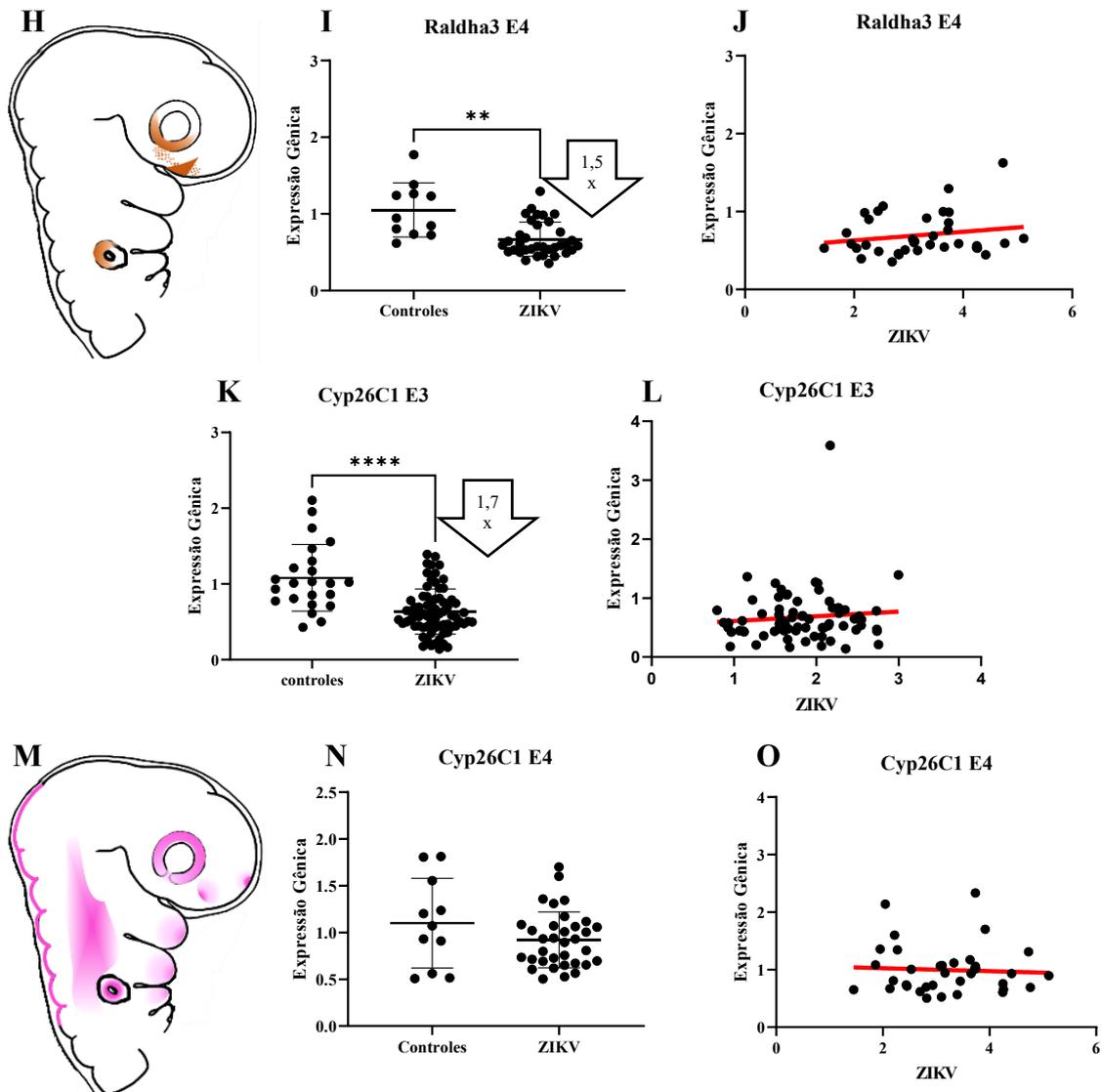
infecção com ZIKV), para análise da expressão de Raldha2 e Raldha3 (responsáveis pela síntese de AR) e Cyp26C1 (degradação e AR). Os resultados demonstraram que os embriões que permaneceram 24h na presença do ZIKV (E3), apresentaram diminuição de 1,76x na expressão de Raldha2 (Fig. 12A) e diminuição de 1,7x na expressão de Cyp26c1 (Fig. 12K), sendo o Cyp26C1 com correlação negativa quanto à carga viral (ou seja, quanto mais ZIKV, menor expressão desta molécula). Por outro lado, houve aumento de 1,15x na expressão de Raldha3 nestes embriões em E3 (Fig. 12F), porém sem correlação com o aumento de ZIKV (Fig. 12G). Já nos embriões em E4, somente Raldha3 apresentou variação significativa, apresentando queda de 1,5x na expressão (Fig. 12I). No entanto, nenhuma destas alterações apresentaram correlação com a carga viral (Fig. 12B, E, G, J, L, O). Em conjunto, estes resultados mostram que a infecção pelo ZIKV é capaz de alterar a expressão dos genes que controlam a produção/degradação do AR, no entanto, esses efeitos são variáveis com o avanço da idade do embrião. De forma geral o ZIKV reduz a expressão de moléculas relacionadas à síntese do AR.

Raldha2 apresentou queda na sua expressão, somente em E3, porém sem correlação quanto à carga viral. Os principais locais de expressão de Raldha2 na cabeça, ilustrados na figura 12C, em E3, são o mesoderma da placa lateral, olhos, somitos e neuroepitélio da região do mesencéfalo e rombencéfalo. Já Raldha3 apresentou aumento na expressão em E3, e queda em E4, sem correlação com carga viral. Os locais de Raldha3 (Fig. 12H) se destacam os olhos, placóides nasais, vesícula ótica e ectoderme da região dos placóides nasais. Cyp26C1, por sua vez, apresentou queda na expressão somente em E3, com correlação quanto à carga viral, e é expresso nos olhos, mesênquima da cabeça, placóides nasais, rombômeros, telencéfalo, vesícula ótica e arcos branquiais (Fig. 12M).

Figura 13 – Expressão de moléculas da via do AR em E3 e E4.

Expressão de Raldha2 (A - E); expressão de Raldha3 (F - J); expressão de Cyp26c1 (K - O). (A) Comparação entre expressão de Raldha2 em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p = 0,0038$); (B) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (C) Em verde, locais de expressão de Raldha2 na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (D) Comparação da expressão de Raldha2 entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 (sem diferença significativa); (E) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação); (F) Comparação entre expressão de Raldha3 em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p = 0,0377$); (G) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (H) Em marrom, locais de expressão de Raldha3 na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (I) Comparação da expressão de Raldha3 entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 ($p = 0,0048$); (J) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação); (K) Comparação entre expressão de Cyp26C1 em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p < 0,0001$); (L) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (M) Em rosa, locais de expressão de Cyp26C1 na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (N) Comparação da expressão de Cyp26C1 entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 (sem diferença significativa); (O) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação). $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação.





Fonte: Elaborada pela autora.

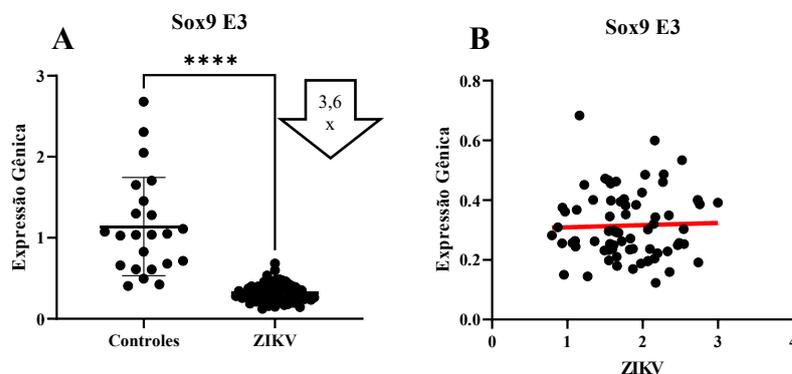
Estes resultados podem sugerir que os níveis de AR são inicialmente perturbados na infecção pelo ZIKV, mas que há uma tentativa de recuperação dos níveis normais em períodos mais avançados do desenvolvimento. Levando em consideração que Cyp26C1 apresentou uma das maiores diferenças de expressão, e é expresso no mesênquima da cabeça (local formado por células da crista neural), que há uma cascata de sinalizações que contribuem para o desenvolvimento do córtex cerebral e ossificação da calota craniana de maneira conjunta, e que possivelmente um dos alvos do ZIKV sejam as células derivadas da crista neural, seguimos para a análise de Sox9 e Sox10, moléculas que contribuem para o monitoramento do caráter mesenquimal e do estado indiferenciado destas células, respectivamente.

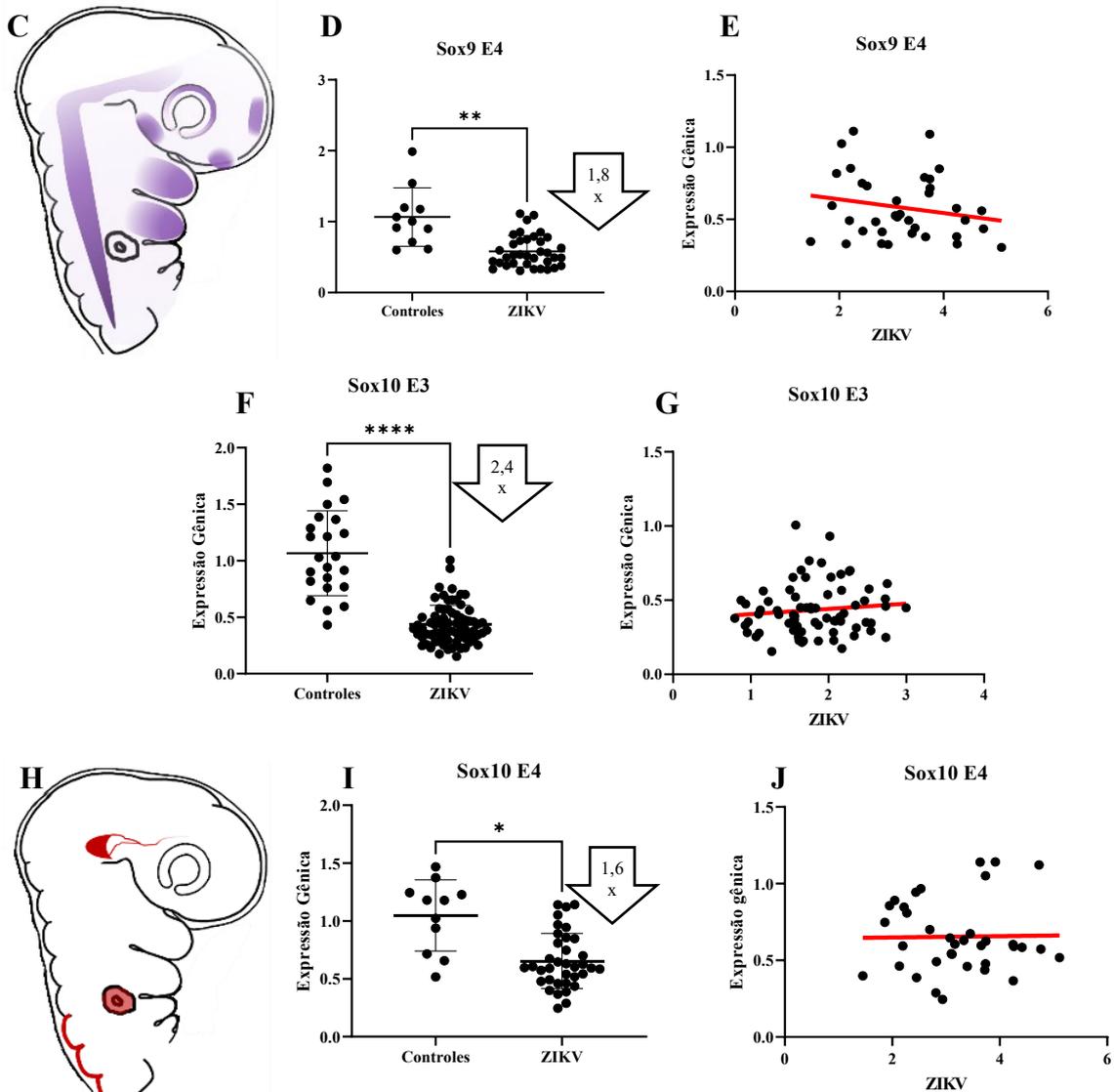
4.6 – A INFECÇÃO PELO ZIKV AUMENTA A EXPRESSÃO DE SOX9 E SOX10

Durante o desenvolvimento inicial das células da crista neural, Sox9 e Sox10 são importantes indicadores do desenvolvimento do mesênquima craniofacial (MORI-AKIYAMA *et al.*, 2003; MCCAULEY *et al.*, 2008), modificações na expressão desses genes, que compõem uma via clássica de sinalização, podem levar a alterações na formação de ossos e cartilagens da cabeça. Além do mesênquima cranial, Sox9 também é expresso nos olhos, placóides nasais, arcos branquiais, partes do telencéfalo, ectoderme do processo frontonasal, e notocorda. Já Sox10 é expresso nos gânglios craniais e vesícula ótica. Após infecção com o ZIKV, verificamos que Sox9 apresentou queda de 3,6x na expressão em E3 (após 24h de inoculação do ZIKV) (Fig. 13A) e 1,83x em E4 (após 48h de inoculação do ZIKV) (Fig. 13D). Já Sox10 apresentou queda de 2,4x na sua expressão em E3 (Fig. 13F) e queda de 1,6x E4 (Fig. 13I). A redução na expressão de Sox9 e Sox10 não apresentou correlação negativa em relação ao ZIKV.

Figura 14 – Expressão de Sox9 e Sox10 em E3 e E4.

(A) Comparação entre expressão de Sox9 em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p < 0,0001$); (B) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (C) Em roxo, locais de expressão de Sox9 na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (D) Comparação da expressão de Sox9 entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 ($p = 0,0018$); (E) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação); (F) Em vermelho, locais de expressão de Sox10 na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (G) Comparação entre expressão de Sox10 em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p < 0,0001$); (H) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (I) Comparação da expressão de Sox10 entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 ($p = 0,0100$); (J) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação). $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação.





Fonte: Elaborado pela autora.

Essa redução na expressão de Sox9 e Sox10 nos embriões infectados pelo ZIKV, pode indicar que o ZIKV tem como alvo as células da crista neural, levando a alterações no desenvolvimento de ossos e cartilagens na cabeça, de alguma forma. Assim, considerando outras moléculas que contribuem para a regulação na formação de ossos na cabeça, analisamos a expressão de Noggin e Gremlin, que são importantes antagonistas de Bmp, fatores esses conhecidamente controladores da diferenciação de osso e cartilagens.

4.7 – A INFECÇÃO COM ZIKV ALTERA A EXPRESSÃO NOGGIN E GREMLIN

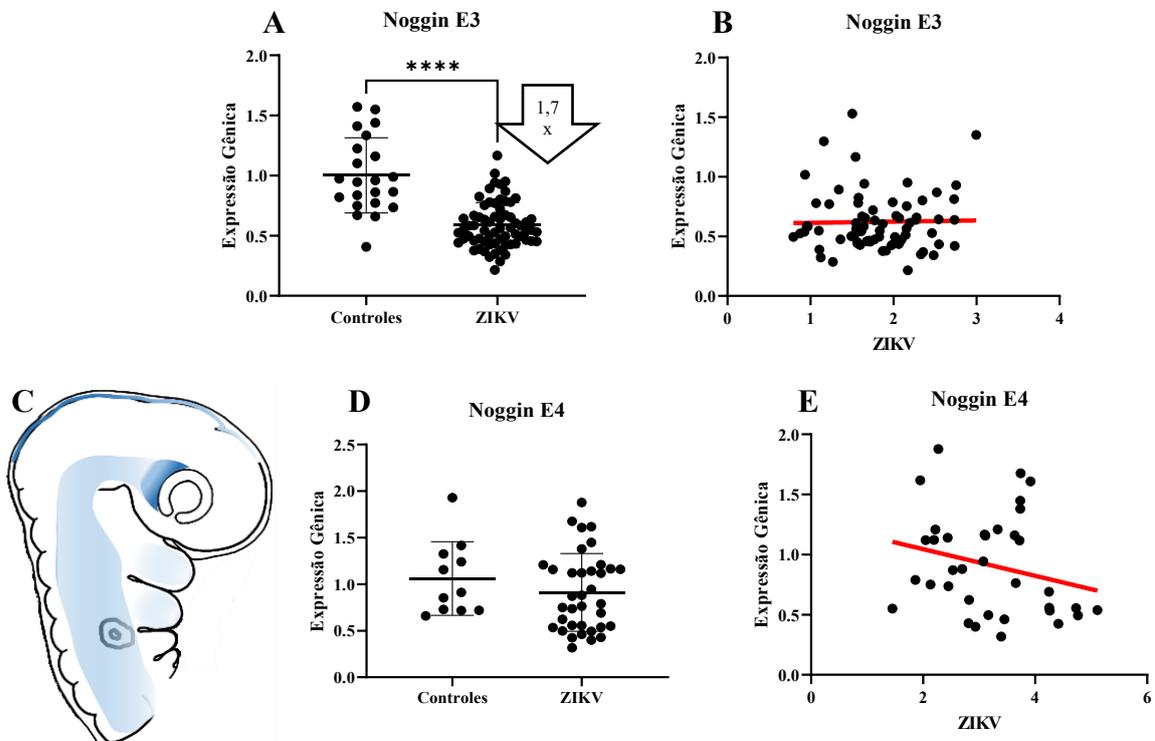
Noggin e Gremlin são proteínas chave no desenvolvimento craniofacial, como citado anteriormente. Aqui, verificamos que houve queda expressiva em ambos os fatores em E3,

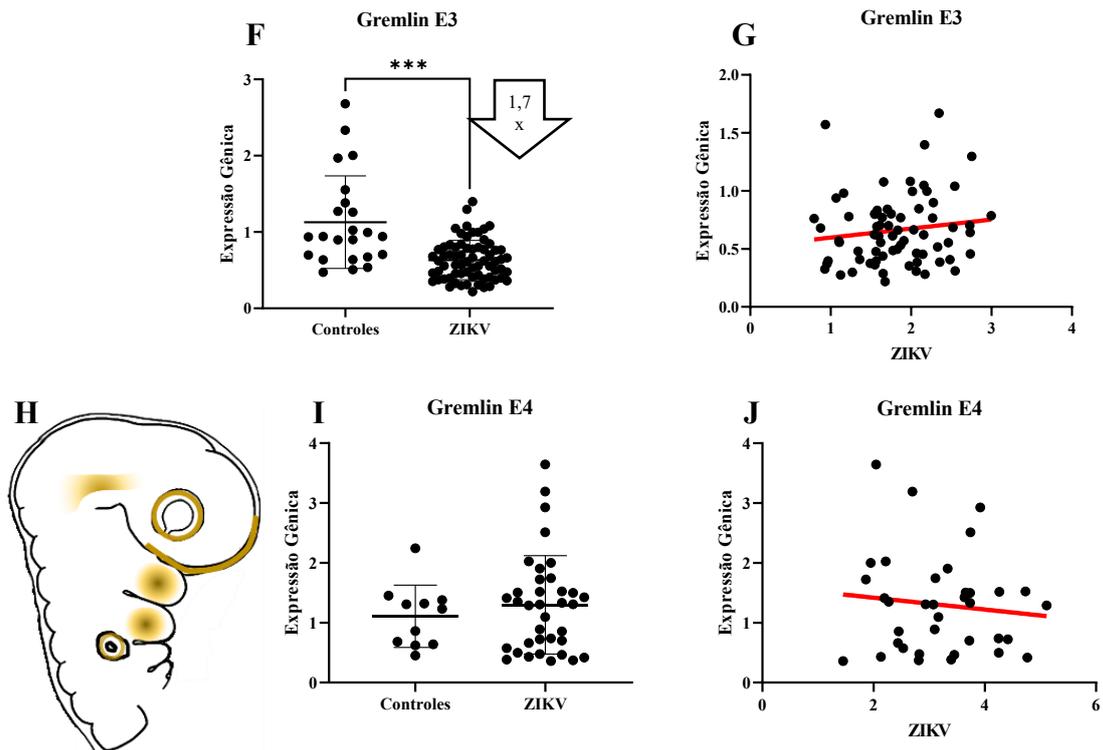
sendo Noggin com queda de 1,7x em sua expressão (Fig. 14A), e Gremlin com queda de 1,78x (Fig. 14F). Nenhuma das moléculas apresentou correlação em relação à carga viral dos embriões, em E3 (Fig. 14B). Em E4 não houve diferença significativa na expressão de ambas as moléculas (Fig. 14D, 14I), assim como não houve correlação com a carga viral (Fig. 14E, 14J).

Noggin é expresso principalmente na notocorda, mesênquima da cabeça e da face, mesencéfalo e arcos branquiais (Fig 14C). Já Gremlin é expresso nos olhos, arcos branquiais, ectoderme do processo frontonasal, vesícula ótica e mesoderme lateral da cabeça (Fig. 14H).

Figura 15 – Expressão de Noggin e Gremlin em E3 e E4.

(A) Comparação entre expressão de Noggin em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p < 0,0001$); (B) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (C) Em cinza, locais de expressão de Noggin na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (D) Comparação da expressão de Noggin entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 (sem diferença significativa); (E) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação); (F) Comparação entre expressão de Gremlin em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p = 0,0005$); (G) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 (sem correlação); (H) Em dourado, locais de expressão de Gremlin na cabeça de embrião com idade aproximada de E3; (I) Comparação da expressão de Gremlin entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 (sem diferença significativa); (J) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 (sem correlação). $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação.





Fonte: Elaborado pela autora.

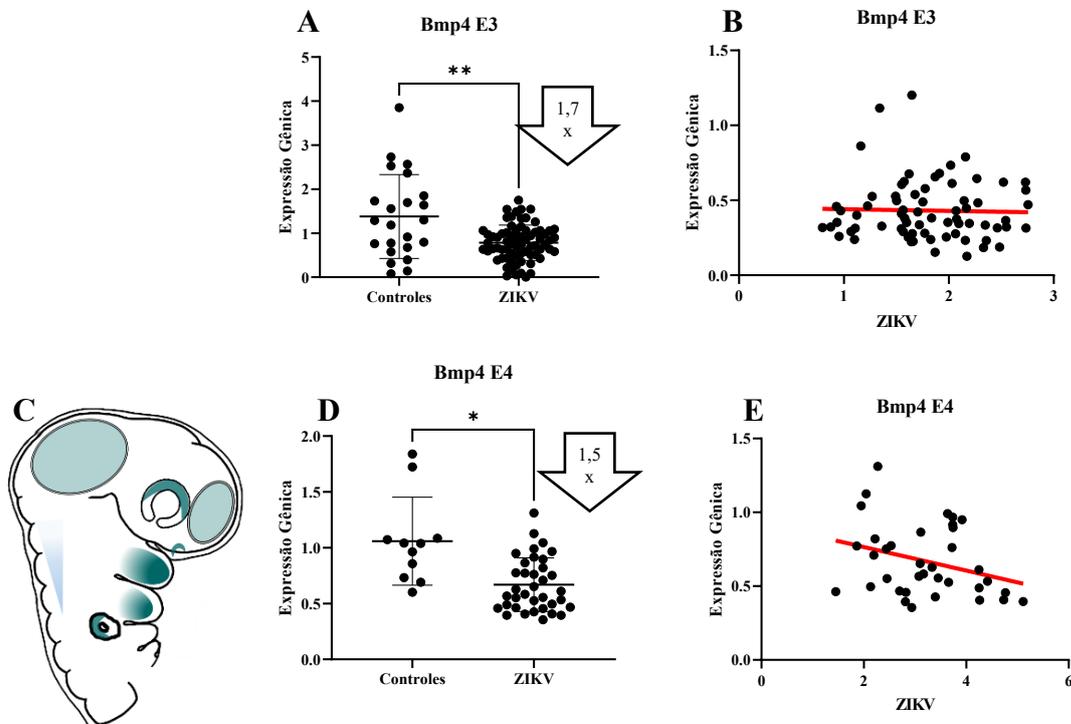
Pode-se observar que a expressão de Noggin e Gremlin são reduzidas no início do desenvolvimento, logo após a infecção pelo ZIKV. Porém, avançando um pouco mais no desenvolvimento (E4) as sinalizações parecem tender à normalidade. Tendo em vista que, durante esse período do desenvolvimento craniofacial, o alvo principal do Noggin e do Gremlin é o Bmp4 expresso pela ectoderme cranial, seguimos para a análise de expressão desta molécula.

4.8 – O ZIKV DIMINUI A EXPRESSÃO DE Bmp4

Com base no padrão de expressão de Bmp4 observado no banco de dados Geisha, nessa fase inicial do desenvolvimento, Bmp4 é expresso mais evidentemente no olho, arcos branquiais, vesícula ótica, rombencéfalo e ectoderme cranial (Fig. 15B). Na infecção pelo ZIKV esta molécula apresentou queda de 1,76x na expressão em E3, e queda de 1,58x na expressão em E4. Em ambos os períodos não houve correlação com a carga viral.

Figura 16 – Expressão de Bmp4 em E3 e E4

(A) Comparação entre expressão de Bmp4 em embriões controles e infectados com ZIKV em E3 ($p = 0,0038$); (B) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E3 ($p = 0,0001$); (C) Locais de expressão de Bmp4; (D) Comparação da expressão de Bmp4 entre embriões controles e infectados com ZIKV em E4 ($p = 0,0296$); (E) Gráfico de correlação entre carga viral e nível de expressão gênica em E4 ($p = 0,0009$). $p \leq 0,05$ foram consideradas como tendo correlação.



Fonte: Elaborado pela autora.

Estes resultados sugerem que o ZIKV altera a sinalização de Bmp4 no desenvolvimento craniofacial. Bmp4 é uma proteína importante, que exerce influência sobre a sinalização de Fgf8. Sua expressão pela ectoderme bloqueia o Fgf8, impedindo que o telencéfalo se desenvolva de maneira apropriada. No entanto, Noggin e Gremlin, expressos pelas células da CN estimuladas por Fgf8, bloqueiam o Bmp4, permitindo que o desenvolvimento inicial do córtex cerebral até que seja requisitado novamente, para a ossificação da calota craniana. Bmp4 é regulado indiretamente por AR (BALMER; BLOMHOFF, 2002), e em conjunto com os demais resultados, podemos inferir que a infecção pelo ZIKV é capaz de alterar o delicado equilíbrio molecular que controla o desenvolvimento craniofacial inicial.

6.0 – DISCUSSÃO

Neste trabalho mostramos que a infecção pelo vírus da Zika causa alterações na sinalização de AR (Fig. 12) e que a expressão de Fgf8 (Fig. 10), Shh (Fig.11), Sox9 (Fig. 13A-E) Sox10 (Fig. 13F-J), Noggin (Fig. 14A-E), Gremlin (Fig. 14F-J) e Bmp4 (Fig. 15) diminuíram com a infecção pelo ZIKV. Vimos que a expressão dos genes que levam à síntese e degradação de AR foram afetadas na infecção pelo ZIKV, porém nenhuma das moléculas apresentou correlação com o ZIKV (Fig. 12B, E, G, J, L, O). Isto pode indicar um mecanismo celular de tentativa de recuperação no balanço ótimo de AR, que deve ser muito preciso para o desenvolvimento normal da cabeça (BAREMBAUM; BRONNER-FRASER, 2005; DE LA CRUZ *et al.*, 1984; ROSA *et al.*, 1986). A diminuição da expressão de Cyp26C1 é um indicativo de que as moléculas de AR que deveriam se ligar nos ERAR dos genes do hospedeiro podem estar sendo sequestradas pelos ERAR do genoma viral. Em outras palavras, a degradação de AR é diminuída, já que esta molécula não estaria contribuindo para a transcrição dos genes que possuem ERAR. É importante destacar que, fisiologicamente, seria mais fácil para estas moléculas de AR se ligarem nos ERAR virais, já que estes estariam distribuídos pelo citoplasma da célula infectada, local no qual o AR é sintetizado (Fig. 12) (BUDHU; NOY, 2002; MADEN, 2007).

Frente a estas variações na expressão de Cyp26C1, as alterações nos níveis de Raldha2 (Fig.12A-E) e Raldha3 (Fig. 12 F-J) poderiam ser um efeito indireto da infecção pelo ZIKV, e a ausência de correlação com o ZIKV reforça essa ideia. Com a diminuição da degradação de AR, causada pelo sequestro de AR pelos ERAR do ZIKV, conseqüentemente haveria maior quantidade de AR nas células. Em resposta a isto, as moléculas de síntese de AR têm uma queda na sua expressão. Nossos achados são consistentes com dados que indicam a estabilização dos níveis ótimos de AR através da manutenção na concentração das enzimas relacionadas à síntese ou degradação de AR (MADEN, 2007; QUADRO *et al.*, 2003).

Importante notar que, dentre as medidas do telencéfalo e mesencéfalo dos embriões, nota-se uma variação significativa dentro dos grupos analisados, fazendo com que as medidas sejam dispersas pelos gráficos. Isto, provavelmente, é um reflexo do posicionamento dos embriões no momento da fotografia, pois o ângulo da cabeça interfere no registro das vesículas, levando a maior variação das medidas. O ideal, para realizar essas medidas, seria a dissecação do SNC (CREUZET *et al.*, 2006; GARCEZ *et al.*, 2013), porém isto impediria as

análises de expressão gênica nos mesmo embriões, já que haveria degradação enzimática do material a ser analisado.

Os sítios de expressão dos genes analisados também podem ilustrar a seletividade do ZIKV quanto aos locais de infecção. Como demonstrado, há diminuição de tamanho do telencéfalo, em E3 (Fig. 9C), porém o mesencéfalo permanece sem alterações, em ambos os períodos analisados (Fig. 9B, E). Thawani e colaboradores (2018) observaram redução de 14% no tamanho do telencéfalo, enquanto nossos dados mostram redução de 21,5%. Esta diferença pode ocorrer por diferenças na cepa viral utilizada, que possui efeitos distintos sobre as células infectadas (JORGACĀEVSKI *et al.*, 2019), e por causa do período após a infecção que os embriões foram analisados. No caso, Thawani e colaboradores utilizaram embriões de galinha em E5, três dias após infecção. De acordo com nossos dados, embriões em E4 (dois dias após a infecção) não apresentam diferença no tamanho do telencéfalo (Fig. 9H)

A diminuição do telencéfalo demonstra um reflexo das alterações moleculares vistas na infecção pelo ZIKV. Mais especificamente, refletem a diminuição da expressão de *Fgf8* e *Shh*, que estimulam a expansão do telencéfalo (THAWANI *et al.*, 2018), e também justificam as alterações de expressão dos genes relacionados à via do AR. Próximo ao processo frontonasal, *Raldha3* tem expressão mais ventral em relação às outras moléculas da via do AR analisadas (Fig. 12F), e apresenta aumento em E3 (Fig. 12G) e queda em E4 (Fig. 12I). Em ambos os dias analisados não há correlação de *Raldha3* com a carga viral (Fig. 12H, J). Sendo assim, o aumento inicial na expressão de *Raldha3*, em E3, pode ser um reflexo imediato da diminuição na expressão de *Fgf8* e *Shh* (relacionados à expansão do telencéfalo, como visto por Crossley e colaboradores (2001)), tendo em vista que o AR possivelmente não está se ligando em seus *enhancers*. Enquanto isso, a diminuição de expressão de *Raldha3* em E4 pode ser uma consequência da diminuição na expressão de *Cyp26C1* vista anteriormente (Fig. 12L). Estes dados sugerem que o local de expressão de *Raldha3* influencia em uma resposta diferente de *Raldha2* e *Cyp26C1* (expressas no processo frontonasal), frente à infecção pelo ZIKV.

Durante o desenvolvimento craniofacial inicial, as interações entre a via de sinalização do AR com as vias de sinalização do *Fgf8* e do *Shh* são muito importantes para o desenvolvimento craniofacial normal (SCHNEIDER *et al.*, 2001). Alguns estudos apontam que *Fgf8* possui ERAR em seus *enhancers* (CUNNINGHAM; DUESTER, 2015; KUMAR; DUESTER, 2014). Isto poderia explicar como a disrupção da sinalização do AR nas células

infectadas pelo ZIKV poderia levar à diminuição dos níveis de Fgf8. O AR sequestrado pelos ERAR do ZIKV deixariam de se ligar nos ERAR de Fgf8, provocando a diminuição da transcrição deste gene como visto em E3 (Fig. 4B). Concomitante a isto, o desenvolvimento do telencéfalo é prejudicado, com menor proliferação e diferenciação celular, apresentando um tamanho menor que o normal neste período (Fig. 9C). Esta explicação está de acordo com dados que mostram que Fgf8 é um dos principais fatores para a proliferação e diferenciação de progenitores neurais no telencéfalo (CREUZET *et al.*, 2004), e Shh também estimula o desenvolvimento do telencéfalo, como já citado, porém parece ser regulado de maneira indireta por AR, ou seja, não possui ERAR mas alterações nos níveis de AR podem levar à um efeito em cascata que causa a diminuição na expressão de Shh (SCHNEIDER *et al.*, 2001). Esta informação é consistente com os dados obtidos, que mostram uma diminuição na expressão de Shh em embriões infectados com ZIKV, com maior variação em E3 do que em E4 (Fig. 11). Isto pode mostrar que, em E3, a diminuição da expressão de Shh pode estar relacionada com a queda de expressão Fgf8 (Fig.4B, 5B), tendo em vista que Fgf8 é capaz de estimular a expressão de Shh e ambos os fatores contribuem juntos para a expansão do telencéfalo (ABZHANOV *et al.*, 2007; OHKUBO *et al.*, 2002; RASH *et al.*, 2007). Além disso, se o ZIKV infectar principalmente a região do processo frontonasal, o padrão de expressão mais ventral de Shh (Fig. 11A) pode acarretar em uma resposta menor frente à infecção pelo ZIKV em 24h de infecção – E3 (Fig. 11C), semelhante ao que foi visto com Raldha3 (Fig. 5F-J), que apresentou uma resposta diferente às demais enzimas da via do AR que são expressas no processo frontonasal.

Considerando a influência de Fgf8 sobre as células da CN (CREUZET *et al.*, 2004), e que a expressão de Noggin e Gremlin por estas células influencia na manutenção do desenvolvimento do telencéfalo (OHKUBO *et al.*, 2002), analisamos a influência do ZIKV sobre a expressão destas moléculas. Vimos que Noggin e Gremlin apresentam diminuição nas suas expressões somente em E3 (Fig. 7), mas nenhuma das moléculas tem correlação negativa com ZIKV (Fig. 7C, E, H, J). Nossos dados mostram que há uma recuperação na expressão destas moléculas em E4 (Fig. 14D-E, I-J), mas a influência que o ZIKV exerce sobre as células da CN em E3 pode ser o suficiente para refletir na sua diferenciação e proliferação celular e na sinalização *downstream* dependente de Noggin e Gremlin. A atividade de Bmp4 é negativamente influenciada por Noggin e Gremlin, potentes antagonistas de Bmps (OHKUBO *et al.*, 2002; ZóÑIGA *et al.*, 1999). Bmp4, produzido pela ectoderme da cabeça

tem papel inibidor sobre a expressão de Fgf8, no entanto, durante o desenvolvimento craniofacial normal, as células da CN cefálica expressam Noggin e Gremlin, bloqueando Bmp4, permitindo a alta expressão de Fgf8 no neuroepitélio e o desenvolvimento normal do telencéfalo (CREUZET *et al.*, 2004). A sinalização Bmp4 volta a ser requisitada, mais à frente no desenvolvimento, para estimular o início da ossificação da calota craniana. Nos nossos experimentos, a expressão de Bmp4 apresentou queda em E3 e E4 (Fig. 9). A diminuição da expressão de Bmp4 pode ser um reflexo de, além do bloqueio físico de Noggin, alteração nos níveis de AR, já que Bmp4 é regulado de maneira indireta por AR (BALMER; BLOMHOFF, 2002), assim como Shh (como já citado), sendo regulado por proteínas que são afetadas por alterações nos níveis de AR. Isto explicaria a queda na expressão de Bmp4, mesmo que seus antagonistas Noggin e Gremlin também tenham apresentado diminuição de expressão em embriões infectados pelo ZIKV. Uma possibilidade para as alterações nas vias celulares representadas até aqui é um efeito em cascata que, a partir da diminuição da ligação de AR nos ERAR do Fgf8, isso provocaria a diminuição da proliferação e diferenciação das CCN, levando à queda de expressão de Noggin e Gremlin. Esse sequestro de AR pelo ZIKV também afetaria indiretamente Shh e Bmp4, levando à queda na sua expressão. Com isso, essa via do desenvolvimento craniofacial envolvendo Fgf8, Shh, Noggin, Gremlin e Bmp4 é afetada pela alteração da sinalização de AR, direta e indiretamente.

Uma grande parte dos ossos da calota craniana são formados a partir de células da CN (SIMÕES-COSTA; BRONNER, 2015). Em crianças com microcefalia causada pelo ZIKV, foi observado aumento da espessura dos ossos da calota craniana e formação de pontos de ossificação no tecido nervoso e afinamento das meninges (ARAGAO *et al.*, 2016); BEAUFRÈRE *et al.*, 2019; Werner *et al.*, 2016). A diminuição na expressão de Bmp4, Noggin e Gremlin podem ser indicadores de que as células da CN são afetadas pelo ZIKV. Bmp4 contribui para a ossificação da calota craniana (CHEN *et al.*, 1997; KIM *et al.*, 1998), e Noggin e Gremlin bloqueiam Bmp4 para a manutenção do desenvolvimento do telencéfalo (HSU *et al.*, 1998; TZAHOR *et al.*, 2003). Além disto, Cyp26C1, molécula de degradação de AR que é expressa no mesênquima da cabeça (formado na sua maioria pelas células da CN), também apresenta queda de expressão, assim como Fgf8, importante para proliferação e diferenciação das células CN (CREUZET *et al.*, 2004). Consistente com estes dados, a análise de expressão de Sox9 e Sox10 demonstrou queda de expressão na infecção pelo ZIKV

(Fig. 6). Sox9 e Sox10 são importantes indicadores respectivamente do estado mesenquimal e indiferenciado das células CN que vão se diferenciar em ossos ou cartilagens (MORI-AKIYAMA *et al.*, 2003; MCCAULEY *et al.*, 2008). Nesta etapa do desenvolvimento que analisamos ainda não há ossificação, porém, estas moléculas servem como marcadores do estágio das células da CN no desenvolvimento – mais adiantadas ou atrasadas, e isso pode acarretar em menos células para se diferenciar no futuro. Ambas as moléculas, Sox9 e Sox10, apresentaram queda de expressão, em E3 (Fig. 6A,F) e E4 (Fig. 6D, I), sem correlação em relação ao ZIKV (Fig. 6C,E,H,J). Estes dados mostram que o ZIKV afeta o desenvolvimento das células da CN, representado pela diminuição na expressão de Sox9 e Sox10, que indicam o caráter mesenquimal e indiferenciado destas células. No caso, a diminuição da expressão destas moléculas pode ser um reflexo de um aumento na morte celular, ou mesmo uma menor proliferação das células da CN na infecção pelo ZIKV, neste estágio do desenvolvimento. Mais à frente no desenvolvimento, na tentativa de uma recuperação da ocupação ideal deste nicho, pode ocorrer uma proliferação celular exacerbada, ocasionando no espessamento dos ossos da calota craniana, que pode estar também associado à queda de expressão de Bmp4. Sox9 e Sox10 são expressos por outros locais na cabeça, porém o que pode explicar estas alterações específicas de ossificação é o sítio de infecção do ZIKV. Como visto, Bmp4 apresenta queda de expressão dependente de AR, mesmo com seus antagonistas também diminuindo a expressão, e isto poderia indicar que a ectoderme da cabeça é um sítio de infecção pelo ZIKV.

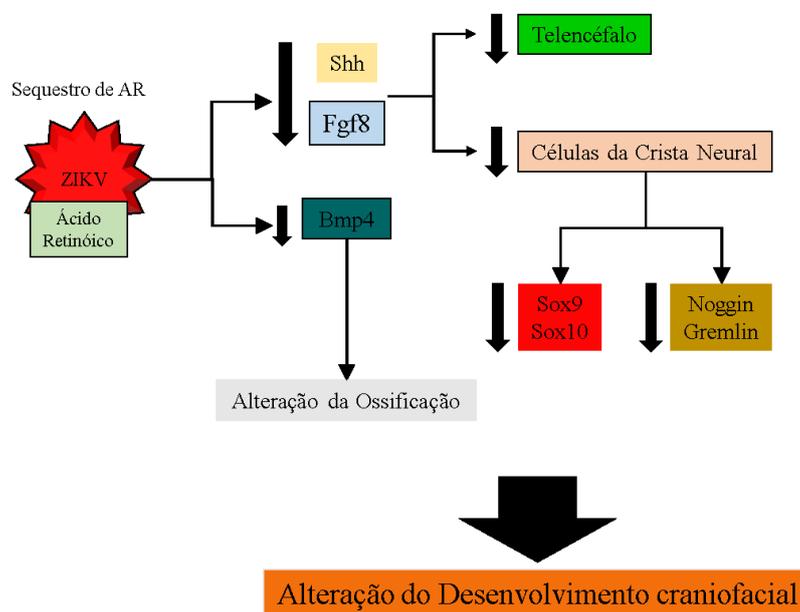
É importante notar que alguns dos genes analisados possuem diferença de expressão entre E3 e E4, como por exemplo Bmp4, Sox9 e Sox10 apresentando queda na expressão em ambos os períodos, porém com menor queda relativa em E4. Isto poderia ser justificado pela intensa proliferação e diferenciação celular que acontece neste intervalo. Entre E3 e E4, são 24h de diferença, porém considerando o curto tempo de desenvolvimento embrionário de *G. gallus* (21 dias), este período é o suficiente para que diferenças de expressão em moléculas envolvidas no desenvolvimento craniofacial seja recuperado. No entanto, os efeitos das modificações moleculares podem ser vistos mais à frente no desenvolvimento, como a diminuição do tamanho do córtex cerebral (Mlakar *et al.*, 2016; Werner *et al.*, 2016) e diminuição na ossificação, como visto por Benevenuti, 2022.

Em resumo, o AR das células infectadas pode estar sendo sequestrado pelos ERAR do ZIKV, deixando de se ligar nos ERAR de Fgf8 e desequilibrando a expressão de moléculas

que são controladas de maneira indireta pelo AR, como Shh (o que provocaria a diminuição do desenvolvimento do telencéfalo) e Bmp. Isto, por sua vez, provocaria um efeito em cascata sobre outras moléculas *downstream*, importantes para o desenvolvimento craniofacial, como Noggin e Gremlin, e interferindo no caráter mesenquimal das CCN (representado pelos níveis de Sox9 e Sox10), levando conseqüentemente à alteração da ossificação da calota craniana mais à frente no desenvolvimento (Fig. 16).

Figura 17 – Hipótese das sinalizações exploradas pelo ZIKV

O sequestro de AR pelos ERAR do genoma viral levam à diminuição de Shh, Fgf8 e Bmp4, levando à alteração da ossificação dos ossos da calota craniana e à diminuição do telencéfalo e da proliferação e diferenciação das células da CN, levando às alterações no desenvolvimento craniofacial vistas na infecção pelo ZIKV.



Fonte: Elaborado pela autora.

Ainda existem muitas lacunas a respeito do AR e seu papel no desenvolvimento craniofacial. O que se sabe é relevante, porém ainda há muito a ser estudado e atualizado. Suas alterações na infecção pelo ZIKV, que ainda não foram exploradas por outros grupos de pesquisa, ilustram que seu papel como parte de uma sinalização mais complexa é pouco estimado. O AR tem potencial para ser um fator central nas alterações do desenvolvimento craniofacial provocadas pelo ZIKV. Estas alterações, quando forem compreendidas, vão auxiliar não apenas na compreensão a respeito dos mecanismos explorados pelo ZIKV, mas também no entendimento acerca do desenvolvimento craniofacial, pois ambos os processos

estão intimamente ligados. Sendo assim, espera-se que os dados produzidos neste trabalho possam, de alguma maneira, auxiliar e incentivar a investigação acerca do ácido retinóico.

7 - CONCLUSÕES

- Dentre os embriões infectados com ZIKV, houve heterogeneidade quanto à carga viral. Com isso, foi possível estabelecer faixas de carga viral e compara-las entre embriões com 24h e 48h de infecção. Importante ressaltar que demais trabalhos que abordam a infecção pelo ZIKV não levam essa heterogeneidade em consideração;
- De acordo com nossas análises de morfologia, fomos capazes de determinar que o ZIKV tem impacto sobre o desenvolvimento inicial do telencéfalo, levando à diminuição do tamanho desta vesícula em E3.
- O telencéfalo apresentou correlação negativa quanto a quantidade de ZIKV, somente em E3. Embora os mesencéfalos analisados em E3 e E4 não apresentaram diferenças de tamanhos, mostraram correlação negativa quanto à carga viral;
- As moléculas relacionadas à síntese e degradação de Ácido Retinóico apresentaram alteração quanto à expressão, sendo *Raldha2* e *Cyp26C1* tendo diminuição na expressão em E3, e *Raldha3* tendo aumento na expressão. Somente *Raldha3* demonstrou variação em E4, apresentando queda de expressão;
- De maneira geral, as moléculas envolvidas no desenvolvimento craniofacial analisadas apresentaram diminuição em suas expressões na infecção pelo ZIKV. Estas moléculas são reguladas direta (*Fgf8*) ou indiretamente (*Shh*, *Bmp4*) por AR, causando um efeito em cascata (*Noggin*, *Gremlin*, *Sox9* e *Sox10*) que leva à alteração do desenvolvimento craniofacial.

8 - PERSPECTIVAS

A partir dos dados gerados no presente trabalho, foram criadas algumas possibilidades acerca de possíveis procedimentos para dar continuação ao estudo.

- Analisar os níveis de Ácido Retinóico durante o desenvolvimento inicial do SNC de *G. gallus*, determinando os períodos de maior presença de AR;
- Determinar se a infecção pelo ZIKV altera o perfil de produção do AR, verificando a produção de AR e enzimas responsáveis pela sua síntese e degradação;

- Mapear / correlacionar alterações morfológicas nos embriões infectados com ZIKV com a produção de AR;
- Realizar ensaios de recuperação de morfologia a partir da suplementação de Ácido Retinóico, em embriões infectados com ZIKV.

REFERÊNCIAS

ABZHANOV, Arhat *et al.* Cross-regulatory interactions between Fgf8 and Shh in the avian frontonasal prominence. **Congenital Anomalies**, [S.L.], v. 47, n. 4, p. 136-148, dez. 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17988255/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

ARAGAO, Maria de Fatima Vasco *et al.* Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **Bmj**, [S.L.], v. 0, n. 0, p. 1901-0, 13 abr. 2016. *BMJ*. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1136/bmj.i1901>. Acesso em: 01 dez. 2022.

BENEVENUTTI, Felipe Zanghelini. **Influência do Vírus da Zika no Desenvolvimento do Sistema Nervoso Central e dos Ossos Cranianos em Embriões de Gallus gallus domesticus**. 2022. 84 f. TCC (Graduação) - Curso de Ciências Biológicas, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

BALMER, James E.; BLOMHOFF, Rune. Gene expression regulation by retinoic acid. **Journal Of Lipid Research**, [S.L.], v. 43, n. 11, p. 1773-1808, nov. 2002. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1194/jlr.r100015-jlr200>. Acesso em: 05 nov. 2022.

CHEN, D. *et al.* Bone Morphogenetic Protein 2 (BMP-2) Enhances BMP-3, BMP-4, and Bone Cell Differentiation Marker Gene Expression During the Induction of Mineralized Bone Matrix Formation in Cultures of Fetal Rat Calvarial Osteoblasts. **Calcified Tissue International**, [S.L.], v. 60, n. 3, p. 283-290, mar. 1997. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s002239900230>. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s002239900230>. Acesso em: 02 dez. 2022.

CHEN, Guiqian *et al.* BMP Signaling in the Development and Regeneration of Cranium Bones and Maintenance of Calvarial Stem Cells. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, v. 8, mar. 2020. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2020.00135>. Acesso em: 20 jan. 2023.

CORRAL, Ruth Diez del *et al.* Opposing FGF and Retinoid Pathways Control Ventral Neural Pattern, Neuronal Differentiation, and Segmentation during Body Axis Extension. **Neuron**, [S.L.], v. 40, n. 1, p. 65-79, set. 2003. Elsevier BV. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/14527434/>. Acesso em: 12 dez. 2020.

CREUZET, Sophie *et al.* Reciprocal relationships between Fgf8 and neural crest cells in facial and forebrain development, **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 101, n. 14, p. 4843–4847, 2004. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/101/14/4843>. Acesso em: 18 jan. 2021.

CREUZET, Sophie E. Regulation of pre-otic brain development by the cephalic neural crest. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [S.L.], v. 106, n. 37, p. 15774-15779, 31 ago. 2009. Proceedings of the National Academy of Sciences. Disponível em: <https://www.pnas.org/content/106/37/15774.short>. Acesso em: 20 jan. 2021.

CREUZET, Sophie E. *et al.* The cephalic neural crest exerts a critical effect on forebrain and midbrain development. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 103, n. 38, p. 14033-14038, 19 set. 2006. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.0605899103>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/16966604/>. Acesso em: 29 nov. 2022.

CROSSLEY, P.H *et al.* Coordinate expression of Fgf8, Otx2, Bmp4, and Shh in the rostral prosencephalon during development of the telencephalic and optic vesicles. **Neuroscience**, [S.L.], v. 108, n. 2, p. 183-206, dez. 2001. Elsevier BV.. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522\(01\)00411-0](http://dx.doi.org/10.1016/s0306-4522(01)00411-0). Acesso em: 3 dez. 2022.

CUNNINGHAM, Thomas J.; DUESTER, Gregg. Mechanisms of retinoic acid signalling and its roles in organ and limb development. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, [S.L.], v. 16, n. 2, p. 110-123, 5 jan. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nrm3932>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4636111/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

DA SILVA-VALENZUELA, M. D. G. *et al.* Hibridização in situ com sonda não-radioativa para mRNA: Princípios e aplicações em patologia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 42, n. 3, p. 207–213, 2006.

DOUARIN, Nicole M. Le; COULY, Gérard; CREUZET, Sophie E.. The neural crest is a powerful regulator of pre-otic brain development. **Developmental Biology**, [S.L.], v. 366, n. 1, p. 74-82, jun. 2012. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ydbio.2012.01.007>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/22269168/>. Acesso em: 23 fev. 2021.

DRAUT, Heidrun *et al.* New Insights into the Control of Cell Fate Choices and Differentiation by Retinoic Acid in Cranial, Axial and Caudal Structures. **Biomolecules**, [S.L.], v. 9, n. 12, p. 860, 11 dez. 2019. MDPI AG. Disponível

em:<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6995509/#!po=51.7544>. Acesso em: 10 dez. 2020.

ETCHEVERS, Heather *et al.* Primary culture of chick, mouse or human neural crest cells. **Nature Protocols**, [S.L.], v. 6, n. 10, p. 1568-1577, 22 set. 2011. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/nprot.2011.398>. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nprot.2011.398#citeas>. Acesso em: 07 jan. 2021.

FERGUSON, James W.; DEVARAJAN, Mahima; ATIT, Radhika P.. Stage-specific roles of Ezh2 and Retinoic acid signaling ensure calvarial bone lineage commitment. **Developmental Biology**, [S.L.], v. 443, n. 2, p. 173-187, nov. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC6217976/>. Acesso em: 10 dez. 2020.

GARCEZ, Ricardo C.; DOUARIN, Nicole M. Le; CREUZET, Sophie E. Combinatorial activity of Six1-2-4 genes in cephalic neural crest cells controls craniofacial and brain development. **Cellular And Molecular Life Sciences**, [S.L.], v. 71, p. 2149-2164, 24 set. 2014. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://link.springer.com/article/10.1007/s00018-013-1477-z>. Acesso em: 26 jan. 2021.

GILBERT, Scott F.; BARRESI, Michael J. F.. **Biologia do Desenvolvimento**. 11ª. ed. Porto Alegre: Artmed, 2019.

GUR, Michal *et al.* Reduced Retinoic Acid Signaling During Gastrulation Induces Developmental Microcephaly. **Frontiers In Cell And Developmental Biology**, v. 10, 14 mar. 2022. Frontiers Media SA. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3389/fcell.2022.844619>. Acesso em: 22 nov. 2022.

HEYMANN, David L *et al.* Zika virus and microcephaly: why is this situation a pheic?. **The Lancet**, [S.L.], v. 387, n. 10020, p. 719-721, fev. 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC7134564/?report=reader#!po=56.2500>. Acesso em: 12 jan. 2021.

HSU, David R *et al.* The Xenopus Dorsalizing Factor Gremlin Identifies a Novel Family of Secreted Proteins that Antagonize BMP Activities. **Molecular Cell**, [S.L.], v. 1, n. 5, p. 673-683, abr. 1998. Elsevier BV.. Disponível em: [http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765\(00\)80067-2](http://dx.doi.org/10.1016/s1097-2765(00)80067-2). Acesso em: 02 dez. 2022.

HU, Diane; MARCUCIO, Ralph S. A SHH-responsive signaling center in the forebrain regulates craniofacial morphogenesis via the facial ectoderm. **Development**, v. 136, n. 1, p.

107-116, 1 jan. 2009. The Company of Biologists.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.026583>. Acesso em: 19 jan. 2023.

JORGAČEVSKI, Jernej *et al.* ZIKV Strains Differentially Affect Survival of Human Fetal Astrocytes versus Neurons and Traffic of ZIKV-Laden Endocytotic Compartments. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 0-0, 30 maio 2019. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: . <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-019-44559-8>. Acesso em: 01 dez. 2022.

KIM, H.J. *et al.* FGF-, BMP- and Shh-mediated signalling pathways in the regulation of cranial suture morphogenesis and calvarial bone development. **Development**, [S.L.], v. 125, n. 7, p. 1241-1251, 1 abr. 1998. The Company of Biologists.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.125.7.1241>. Acesso em: 02 dez. 2022.

KUMAR, Ashutosh *et al.* A Possible Mechanism of Zika Virus Associated Microcephaly: imperative role of retinoic acid response element (rare) consensus sequence repeats in the viral genome. **Frontiers In Human Neuroscience**, [S.L.], v. 10, p. 403, 9 ago. 2016. Frontiers Media SA. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fnhum.2016.00403/full>. Acesso em: 06 dez. 2020.

KUMAR, Sandeep; DUESTER, Gregg. Retinoic acid controls body axis extension by directly repressing *Fgf8* transcription. **Development**, [S.L.], v. 141, n. 15, p. 2972-2977, 1 ago. 2014. The Company of Biologists. <http://dx.doi.org/10.1242/dev.112367>. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4197666/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

LADHANI, Shamez N *et al.* Outbreak of Zika virus disease in the Americas and the association with microcephaly, congenital malformations and Guillain–Barré syndrome. **Archives Of Disease In Childhood**, [S.L.], v. 101, n. 7, p. 600-602, 14 mar. 2016. BMJ. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4941169/#!po=85.0000>. Acesso em: 12 jan. 2021.

LAUE, Kathrin *et al.* Craniosynostosis and Multiple Skeletal Anomalies in Humans and Zebrafish Result from a Defect in the Localized Degradation of Retinoic Acid. **The American Journal Of Human Genetics**, [S.L.], v. 89, n. 5, p. 595-606, nov. 2011. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3213388/?report=reader>. Acesso em: 10 dez. 2020.

LI, Cui *et al.* Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 19, n. 5, p. 672, nov. 2016. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.10.017>. Acesso em: 20 nov. 2022.

MADEN, Malcolm. Retinoic acid in the development, regeneration and maintenance of the nervous system. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 8, n. 10, p. 755-765, out. 2007. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn2212>. Acesso em: 28 nov. 2020.

MCCAULEY, David W. *et al.* SoxE, Type II collagen, and Evolution of the Chondrogenic Neural Crest. **Zoological Science**, [S.L.], v. 25, n. 10, p. 982-989, out. 2008. Zoological Society of Japan. <http://dx.doi.org/10.2108/zsj.25.982>. Disponível em: <https://bioone.org/journals/zoological-science/volume-25/issue-10/zsj.25.982/SoxE-Type-II-collagen-and-Evolution-of-the-Chondrogenic-Neural/10.2108/zsj.25.982.short>. Acesso em: 01 nov. 2022.

MLAKAR, Jernej *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 374, n. 10, p. 951-958, 10 mar. 2016. Massachusetts Medical Society. Disponível em: https://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1600651?url_ver=Z39.88-2003&rfr_id=ori%3Arid%3Aacrossref.org&rfr_dat=cr_pub++0pubmed. Acesso em: 12 dez. 2020.

MORI-AKIYAMA, Yuko *et al.* Sox9 is required for determination of the chondrogenic cell lineage in the cranial neural crest. **Proceedings Of The National Academy Of Sciences**, [S.L.], v. 100, n. 16, p. 9360-9365, 23 jul. 2003. Proceedings of the National Academy of Sciences. <http://dx.doi.org/10.1073/pnas.1631288100>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/12878728/>. Acesso em: 01 nov. 2022.

MULLIS, K.; *et al.* (1986). Specific Enzymatic Amplification of DNA In Vitro: The Polymerase Chain Reaction. **Cold Spring Harbour**, [S.L.], v. 51(0), p. 263-273, 1986. doi:10.1101/sqb.1986.051.01.032.

OHKUBO, Y *et al.* Coordinate regulation and synergistic actions of BMP4, SHH and FGF8 in the rostral prosencephalon regulate morphogenesis of the telencephalic and optic vesicles. **Neuroscience**, [S.L.], v. 111, n. 1, p. 1-17, abr. 2002. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11955708/>. Acesso em: 13 nov. 2022.

Organização Mundial da Saúde. **The history of zika virus**. 2016. World Health Organization. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/feature-stories/detail/the-history-of-zika-virus>. Acesso em: 14 jan. 2023.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). World Health Organization. **Zika - epidemiological update**: 10 mar. 2017. Disponível em: <https://www.paho.org/en/documents/10-march-2017-zika-epidemiological-update-0>. Acesso em: 23 fev. 2021.

PAN AMERICAN HEALTH ORGANIZATION (PAHO). World Health Organization. **Zika cases and congenital syndrome associated with Zika virus reported by countries and territories in the Americas, 2015 – 2018**: Cumulative Cases. 04 Jan. 2018. Disponível em: https://www.paho.org/hq/index.php?option=com_docman&view=download&category_slug=cumulative-cases-pdf-8865&alias=43296-zika-cumulative-cases-4-january-2018-296&Itemid=270&lang=en. Acesso em: 23 Fev. 2021.

PANG, Huanhuan *et al.* Aberrant NAD⁺ metabolism underlies Zika virus–induced microcephaly. **Nature Metabolism**, [S.L.], v. 3, n. 8, p. 1109-1124, 12 ago. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s42255-021-00437-0>. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/34385701/>. Acesso em: 20 nov. 2022.

RAMALHO, Andréa. **Vitamina A**. São Paulo: International Life Sciences Institute do Brasil - ILSI, 2010. p. 3. Volume 12. Disponível em: <https://bitly.com/qoCGJoYXN>. Acesso em: 18 nov. 2022.

RASH, B. G. *et al.* Patterning the Dorsal Telencephalon: a role for sonic hedgehog?. **Journal Of Neuroscience**, [S.L.], v. 27, n. 43, p. 11595-11603, 24 out. 2007. Society for Neuroscience.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1523/jneurosci.3204-07.2007>. Acesso em: 2 dez. 2022.

RHINN, M.; DOLLE, P.. Retinoic acid signalling during development. **Development**, [S.L.], v. 139, n. 5, p. 843-858, 7 fev. 2012. The Company of Biologists. Disponível em: <https://dev.biologists.org/content/139/5/843>. Acesso em: 3 dez. 2020.

SANTAGATI, Fabio; RIJLI, Filippo M.. Cranial neural crest and the building of the vertebrate head. **Nature Reviews Neuroscience**, [S.L.], v. 4, n. 10, p. 806-818, out. 2003. Springer Science and Business Media LLC. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/nrn1221>. Acesso em: 14 jan. 2021.

SCHNEIDER, Richard A. *et al.* Local retinoid signaling coordinates forebrain and facial morphogenesis by maintaining FGF8 and SHH. **Development**, v. 128, n. 14, p. 2755-2767, 15 jul. 2001. The Company of Biologists. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.128.14.2755>. Acesso em: 19 jan. 2023.

SIMÕES-COSTA, Marcos; BRONNER, Marianne E.. Establishing neural crest identity: a gene regulatory recipe. **Development**, [S.L.], v. 142, n. 2, p. 242-257, 15 jan. 2015. The Company of Biologists.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1242/dev.105445>. Acesso em: 02 dez. 2022

SHARMA, Rameshkumar. Craniosynostosis. **Indian Journal Of Plastic Surgery**, [S.L.], v. 46, n. 1, p. 18, 2013. Georg Thieme Verlag KG. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3745117/>. Acesso em: 11 dez. 2020.

STERN, Robert S. *et al.* Isotretinoin and pregnancy. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 10, n. 5, p. 851-854, maio 1984. Elsevier BV. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/6233342/>. Acesso em: 23 nov. 2022.

TANG, Hengli *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, [S.L.], v. 18, n. 5, p. 587-590, maio 2016. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5299540/?report=reader#!po=75.0000>. Acesso em: 12 jan. 2021.

THAWANI, Ankita *et al.* Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. **Cell Reports**, [S.L.], v. 23, n. 3, p. 692-700, abr. 2018. Elsevier BV. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S2211124718304418?via%3Dihub>. Acesso em: 14 jan. 2021.

TZAHOR, Eldad; KEMPF, Hervé; MOOTOOSAMY, Roy C.; POON, Andy C.; ABZHANOV, Arhat; TABIN, Clifford J.; DIETRICH, Susanne; LASSAR, Andrew B.. Antagonists of Wnt and BMP signaling promote the formation of vertebrate head muscle. **Genes & Development**, [S.L.], v. 17, n. 24, p. 3087-3099, 15 dez. 2003. Cold Spring Harbor Laboratory.. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1101/gad.1154103>. Acesso em: 02 dez. 2022.

UNITED STATES. Centers For Disease Control And Prevention (CDC). U.S. Department of Health & Human Services. **Zika and Guillain-Barré Syndrome**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/healtheffects/gbs-qa.html>. Acesso em: 13 jan. 2021.

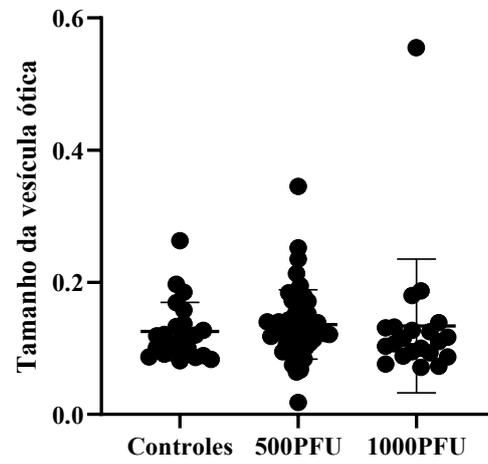
UNIVERSITY OF ARIZONA (United States). **GEISHA - Gallus Expression In Situ Hybridization Analysis**. Disponível em: <http://geisha.arizona.edu/geisha/index.jsp>. Acesso em: 28 nov. 2022.

WEN, Zhexing *et al.* How does Zika virus cause microcephaly? **Genes & Development**, [S.L.], v. 31, n. 9, p. 849-861, 1 maio 2017. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5458753/#!po=57.4074>. Acesso em: 13 jan. 2021.

WU, Shanshan *et al.* Nervous System Injury and Neuroimaging of Zika Virus Infection. **Frontiers In Neurology**, [S.L.], v. 9, n 227, 23 abr. 2018. Frontiers Media SA. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5926540/>. Acesso em: 13 jan. 2021.

XU, Yue *et al.* Molecular and Cellular Characterization of Mouse Calvarial Osteoblasts Derived from Neural Crest and Paraxial Mesoderm. **Plastic And Reconstructive Surgery**, v. 120, n. 7, p. 1783-1795, dez. 2007. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1097/01.prs.0000279491.48283.51>. Acesso em: 18 jan. 2023.

ZÑIGA, Aimée *et al.* Signal relay by BMP antagonism controls the SHH/FGF4 feedback loop in vertebrate limb buds. **Nature**, [S.L.], v. 401, n. 6753, p. 598-602, out. 1999. Disponível em: <https://www.nature.com/articles/44157>. Acesso em: 13 nov. 2022.

Anexo A – Análise das medidas da vesícula ótica dos embriões

Fonte: Elaborada pela autora (2022).