



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

Lucas Trentin Larentis

**Impactos da infecção pelo vírus Zika sobre o controle molecular e aspectos
morfológicos do desenvolvimento inicial de estruturas derivadas do
prosencefalo**

Florianópolis
2024

Lucas Trentin Larentis

Impactos da infecção pelo vírus Zika sobre o controle molecular e aspectos morfológicos do desenvolvimento inicial de estruturas derivadas do prosencéfalo

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

Orientador: Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.

Florianópolis

2024

Ficha catalográfica gerada por meio de sistema automatizado gerenciado pela BU/UFSC.
Dados inseridos pelo próprio autor.

Larentis, Lucas Trentin

Impactos da infecção pelo vírus Zika sobre o controle molecular e aspectos morfológicos do desenvolvimento inicial de estruturas derivadas do prosencéfalo / Lucas Trentin Larentis ; orientador, Ricardo Castilho Garcez, 2024.

62 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências Biológicas, Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento, Florianópolis, 2024.

Inclui referências.

1. Biologia Celular e do Desenvolvimento. 2. vírus Zika. 3. desenvolvimento craniofacial. 4. síndrome congênita. I. Garcez, Ricardo Castilho . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento. III. Título.

Lucas Trentin Larentis

Impactos da infecção pelo vírus Zika sobre o controle molecular e aspectos morfológicos do desenvolvimento inicial de estruturas derivadas do prosencéfalo

O presente trabalho em nível de Mestrado foi avaliado e aprovado, em 29 de maio de 2024, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

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

Profa. Talita da Silva Jeremias, Dra.
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.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof. Ricardo Castilho Garcez, Dr.
Orientador

Florianópolis, 2024.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram de forma direta ou indireta para a realização deste estudo.

Ao professor Ricardo, pela paciência, pelo apoio e incentivo constantes, por todos os esforços para viabilizar a realização do trabalho e pela confiança desde o começo. Muito obrigado!

Ao Jean, pela amizade sincera, por me ajudar com várias questões não acadêmicas, pelas conversas na hora do chimarrão e por me acompanhar desde o começo.

Aos meus familiares, pelo apoio e pela compreensão durante todos esses anos que estou longe.

Aos colegas da turma de mestrado, especialmente aos meus amigos mais próximos.

Aos colegas de orientador, Nathali, Camila, Peterson, Daniely, Fernanda e Raphaella, pelos momentos compartilhados e pela ajuda ao longo do curso.

Aos demais colegas do Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual, à professora Andréa e à professora Talita, pela convivência, pela colaboração e pelo suporte.

À professora Patricia, minha querida amiga e orientadora durante a graduação, que me apresentou o mundo acadêmico e sempre me incentivou a cursar o mestrado. Obrigadão!

Aos amigos que fiz durante este tempo.

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade em avaliar e pelas contribuições ao trabalho.

À Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, do Instituto Carlos Chagas/Fiocruz, e ao prof. Dr. Daniel Santos Mansur, do Laboratório de Imunobiologia da UFSC, pela doação de alíquotas de vírus Zika.

Ao Biotério de Avicultura da Fazenda Experimental da Ressacada (CCA/UFSC) e à Granja Faria S.A. (Lauro Müller/SC), pela doação dos ovos fertilizados para a realização do estudo.

Ao Laboratório de Imunologia Aplicada à Aquicultura (CCB/UFSC), pelo acesso ao ultracongelador.

Ao Laboratório Rona-Pitaluga (CCB/UFSC), pelo uso do fluorímetro e pelo acesso ao ultracongelador.

Ao professor Márcio Alvarez da Silva, pelo empréstimo do micrótomo.

Ao Laboratório Multiusuário de Estudos em Biologia (CCB/UFSC), pelo fornecimento de água ultrapura, gelo e pelo gerenciamento da sala fria.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Inovação do Estado de Santa Catarina (Fapesc), pela concessão de uma bolsa de mestrado.

À Fundação de Amparo à Pesquisa e Extensão Universitária (FAPEU), pelo gerenciamento dos recursos do projeto de pesquisa.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pelo fomento à pós-graduação no Brasil.

A todos que trabalham na Universidade Federal de Santa Catarina.

Ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e do Desenvolvimento.

À Universidade Federal de Santa Catarina, por possibilitar a formação de profissionais qualificados.

Eles nos criaram, o nosso corpo e a nossa mente, e a preservação deles é a razão última da nossa existência. Percorreram um longo caminho, esses replicadores. Agora, respondem pelo nome de genes, e nós somos suas máquinas de sobrevivência (Dawkins, 2007, p. 66)

RESUMO

A infecção materna pelo vírus Zika (ZIKV) durante a gestação está associada a um conjunto de condições clínicas em recém-nascidos conhecido como síndrome congênita do vírus Zika (SCZ). As manifestações clínicas apresentadas por pacientes com a SCZ incluem, dentre outras, microcefalia, calcificações no tecido cerebral, ventriculomegalia e anomalias oftalmológicas. Os mecanismos subjacentes a estes efeitos abrangentes da infecção pelo ZIKV sobre o desenvolvimento craniofacial, além do córtex cerebral, ainda não são totalmente compreendidos. O objetivo deste trabalho foi investigar os impactos da infecção pelo ZIKV sobre vias moleculares e aspectos morfológicos relacionados à padronização e ao desenvolvimento do prosencéfalo e estruturas derivadas. O estudo foi realizado com embriões de *Gallus gallus* com três dias de idade, para as análises de expressão gênica, e com cinco dias de idade, para as análises morfológicas. Em ambos os casos, ovos fertilizados de *G. gallus* foram inoculados com uma solução contendo ZIKV próximo à região cefálica no segundo dia de desenvolvimento. Os embriões foram coletados 24 h ou 72 h depois da inoculação, conforme o grupo experimental. O RNA total dos embriões de três dias foi extraído para as análises de quantificação viral e de expressão gênica, ambas por RT-qPCR. Os embriões com cinco dias tiveram suas cabeças isoladas e fixadas. O RNA total do corpo dos embriões de cinco dias foi usado para quantificar a carga viral individual. As análises computacionais de interações intergênicas e interproteicas foram realizadas com as plataformas GeneMANIA e STRING Database. As análises estatísticas foram realizadas por meio do R e do RStudio. A exposição ao ZIKV em embriões de três dias de idade reduziu a expressão de genes relacionados à padronização e ao desenvolvimento do prosencéfalo, como *SIX3*, *LHX2*, *NR2E1*, *HES1*, *CER1* e *NEUROG2*. A razão entre a largura e o comprimento do telencéfalo foi impactada e aspectos morfológicos do telencéfalo, do diencéfalo e dos olhos foram correlacionados negativamente à carga viral individual em embriões de cinco dias. Observou-se também que a infecção pelo ZIKV impactou o crescimento do neuroepitélio subpalial ao longo do eixo ântero-posterior. Análises de correlação entre os dados de expressão gênica de embriões de três dias indicaram que a infecção pelo ZIKV pode desequilibrar a dinâmica das interações entre os genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial. Adicionalmente, investigações computacionais de interações gênicas e proteicas revelaram possíveis alvos moleculares do ZIKV, potencialmente relacionados aos impactos morfológicos observados no desenvolvimento de estruturas derivadas do prosencéfalo. Conjuntamente, estes resultados sugerem que a infecção pelo ZIKV interfere em vias moleculares integradas que atuam desde muito cedo no desenvolvimento do sistema nervoso central, o que poderia explicar a multiplicidade de alterações no desenvolvimento craniofacial apresentada por pacientes com SCZ.

Palavras-chave: vírus Zika; desenvolvimento craniofacial; síndrome congênita.

ABSTRACT

Maternal infection by Zika virus (ZIKV) during pregnancy is associated with a set of clinical conditions in newborns known as congenital Zika syndrome (CZS). Clinical manifestations observed in patients with CZS include, among others, microcephaly, brain tissue calcifications, ventriculomegaly, and ophthalmologic anomalies. The underlying mechanisms of these broad effects of ZIKV infection on craniofacial development, beyond the cerebral cortex, are not yet fully understood. The objective of this study was to investigate the impacts of ZIKV infection on molecular pathways and morphological aspects related to the patterning and development of the prosencephalon and derived structures. The study was conducted using three-day-old *Gallus gallus* embryos for gene expression analyses and five-day-old embryos for morphological analyses. In both cases, fertilized eggs of *G. gallus* were inoculated with a solution containing ZIKV near the cephalic region on the second day of development. The embryos were collected 24 h or 72 h after inoculation, depending on the experimental group. Total RNA from three-day-old embryos was extracted for viral quantification and gene expression analyses, both by RT-qPCR. Five-day-old embryos had their heads isolated and fixed. Total RNA from the bodies of five-day-old embryos was used to quantify individual viral load. Computational analyses of intergenic and interprotein interactions were performed using the GeneMANIA and STRING Database platforms. Statistical analyses were conducted with R and RStudio. Exposure to ZIKV in three-day-old embryos reduced the expression of genes related to forebrain patterning and development, like *SIX3*, *LHX2*, *NR2E1*, *HES1*, *CER1*, and *NEUROG2*. The ratio between width and length of the telencephalon was affected, and morphological aspects of the telencephalon, diencephalon, and eyes were negatively correlated with individual viral load in five-day-old embryos. It was also observed that ZIKV infection impacted the growth of the subpallial neuroepithelium along the anteroposterior axis. Correlation analyses between gene expression data from three-day-old embryos indicated that ZIKV infection may disrupt the dynamics of interactions among genes involved in craniofacial development. Additionally, computational investigations of gene and protein interactions revealed possible molecular targets of ZIKV, potentially related to the morphological impacts observed in the development of forebrain-derived structures. Taken together, these results suggest that ZIKV infection interferes with integrated molecular pathways that act very early in the development of the central nervous system, which could explain the multiplicity of alterations in craniofacial development presented by patients with SCZ.

Keywords: Zika virus; craniofacial development; congenital syndrome.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|---------|--|
| ANR | Borda neural anterior |
| CCA | Centro de Ciências Agrárias |
| CCB | Centro de Ciências Biológicas |
| CEUA | Comissão de Ética no Uso de Animais |
| CIBio | Comissão Interna de Biossegurança |
| CQB | Certificado de qualidade em Biossegurança |
| E2 | Dia embrionário 2 |
| E3 | Dia embrionário 3 |
| E5 | Dia embrionário 5 |
| E11.5 | Dia embrionário 11 e meio |
| Fiocruz | Fundação Oswaldo Cruz |
| ICC | Instituto Carlos Chagas |
| LACERT | Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual |
| NB-2 | Nível de biossegurança 2 |
| PBS | Solução salina tamponada |
| RNA | Ácido ribonucleico |
| SCZ | Síndrome congênita do vírus Zika |
| UFSC | Universidade Federal de Santa Catarina |
| ZIKV | Vírus Zika |

Neste trabalho, os nomes de genes e proteínas para a espécie *Gallus gallus* foram escritos conforme as diretrizes de nomenclatura estabelecidas para humanos: nomes de genes são escritos com todas as letras em caixa alta e em itálico; e nomes de proteínas são escritos somente com as letras em caixa alta (Bruford *et al.*, 2020; Burt *et al.*, 2009). Nomes de genes de *Drosophila* sp. foram escritos conforme o padrão estabelecido historicamente, usando apenas letras em caixa baixa e em itálico (Roberts, 2006).

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------|---|
| ρ | Coeficiente de correlação de postos de Spearman |
| $^{\circ}\text{C}$ | Grau Celsius |
| h | Hora |
| log10 | Logaritmo de base 10 |
| μL | Microlitro |
| μm | Micrômetro |
| min | Minuto |
| mm | Milímetro |
| pb | Par de bases |
| % | Por cento (1/100) |
| p | Probabilidade de significância (valor-p) |
| PFU | Unidade formadora de placa |
| × | Veza (multiplicação) |

SUMÁRIO

| | | |
|----------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 12 |
| 1.1 | VÍRUS ZIKA E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS À INFECÇÃO | 12 |
| 1.2 | PADRONIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PROSENCÉFALO..... | 14 |
| 2 | OBJETIVOS..... | 20 |
| 2.1 | OBJETIVO GERAL | 20 |
| 2.2 | OBJETIVOS ESPECÍFICOS..... | 20 |
| 3 | METODOLOGIA | 21 |
| 3.1 | DESENHO EXPERIMENTAL..... | 21 |
| 3.2 | INOCULAÇÃO <i>IN OVO</i> E COLETA DOS EMBRIÕES..... | 22 |
| 3.3 | EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE RNA E QUANTIFICAÇÃO VIRAL | 23 |
| 3.4 | AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA | 23 |
| 3.5 | REGISTRO FOTOGRÁFICO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO | 24 |
| 3.6 | AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA | 25 |
| 3.7 | ANÁLISES COMPUTACIONAIS DE INTERAÇÕES ENTRE GENES E PROTEÍNAS | 27 |
| 3.8 | ANÁLISE ESTATÍSTICA..... | 28 |
| 4 | RESULTADOS | 30 |
| 4.1 | A EXPOSIÇÃO AO ZIKV REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DO PROSENCÉFALO | 30 |
| 4.2 | A EXPRESSÃO DE GENES-ALVO DE LHX2 É ALTERADA PELO ZIKV .. | 31 |
| 4.3 | A INFECÇÃO PELO ZIKV IMPACTA O PADRÃO DE CRESCIMENTO DO TELENCÉFALO | 33 |
| 4.4 | O DIÂMETRO MÉDIO DOS OLHOS ESTÁ CORRELACIONADO À QUANTIDADE DE ZIKV..... | 35 |
| 4.5 | A ESPESSURA DA PAREDE DO TELENCÉFALO VENTRAL É IMPACTADA PELO ZIKV..... | 36 |
| 4.6 | ANÁLISES COMPUTACIONAIS REVELAM POSSÍVEIS ALVOS MOLECULARES DO ZIKV..... | 38 |
| 5 | DISCUSSÃO..... | 43 |
| 6 | CONSIDERAÇÕES FINAIS..... | 48 |
| | REFERÊNCIAS | 50 |

1 INTRODUÇÃO

O vírus Zika (ZIKV) foi isolado pela primeira vez de um primata não humano no final da década de 1940, numa pequena região de floresta conhecida como Ziika¹, na Uganda (Dick; Kitchen; Haddow, 1952). Apesar dos supostos relatos de infecção pelo ZIKV em humanos pouco tempo depois (MacNamara, 1954), as primeiras observações clínicas de um caso confirmado foram feitas por Simpson (1964). Infecções sintomáticas pelo ZIKV permaneceram por décadas restritas a regiões da África e da Ásia, onde foram registrados pequenos surtos esporádicos até 2007 (Plourde; Bloch, 2016). Devido aos sintomas leves e diagnósticos imprecisos, quadros de infecção pelo ZIKV eram raramente investigados (Baud *et al.*, 2017). Antes de 2007, apenas 14 casos de infecção humana pelo ZIKV haviam sido registrados (Vorou, 2016; Wikan; Smith, 2016).

O primeiro surto epidêmico fora da África e da Ásia ocorreu em 2007, na Micronésia (Song *et al.*, 2017). Nos anos seguintes, o vírus se espalhou para países do Sudeste asiático e do Oceano Pacífico (Zanluca; Santos, 2016). Acredita-se que o ZIKV tenha chegado ao território brasileiro entre 2013 e 2015, a partir de onde se espalhou rapidamente para outros países americanos (Baud *et al.*, 2017). A situação epidêmica nas Américas passou a ser preocupante após uma possível associação entre casos de microcefalia congênita e a infecção materna pelo ZIKV (Dyer, 2015). Durante a epidemia no Brasil, entre 2015 e 2016², mais de 300 mil pessoas foram infectadas, incluindo mais de 25 mil gestantes (Oliveira *et al.*, 2017). No período de 2015 a 2017, foram notificados 15.368 casos de microcefalia no país, dos quais 2.369 tiveram a infecção pelo ZIKV confirmada (Peiter *et al.*, 2020).

1.1 VÍRUS ZIKA E COMPLICAÇÕES ASSOCIADAS À INFECÇÃO

Conforme o Comitê Internacional de Taxonomia de Vírus (Lefkowitz *et al.*, 2018; Postler *et al.*, 2023), o vírus Zika (ZIKV) é classificado taxonomicamente como membro da família *Flaviviridae*, gênero *Orthoflavivirus*, espécie *Orthoflavivirus zikaense* – este gênero também inclui outros causadores de arboviroses, como os

¹ *Ziika* é um termo na língua luganda que significa “crescido, coberto” e remete à vegetação do local; o segundo “i” da palavra foi removido por influência europeia (Henry, 2014; Schwartz, 2017).

² Dados referentes ao período de 01 de janeiro de 2015 a 12 de novembro de 2016.

vírus da dengue (*O. denguei*; DENV), da febre amarela (*O. flavi*; YFV) e da encefalite japonesa (*O. japonicum*; JEV). O genoma do ZIKV é composto por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA), de sentido positivo, que codifica uma poliproteína (Hou *et al.*, 2017). Após processamento na célula hospedeira, são originadas três proteínas estruturais (capsídeo, C; pré-membrana/membrana, prM/M; e envelope, E), que formam o vírion, e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), envolvidas sobretudo na replicação viral e evasão imune (Liu; Shi; Qin, 2019).

Quando sintomática, a infecção pelo ZIKV é conhecida como febre Zika ou doença do vírus Zika (Rajendram; Preedy; Patel, 2021). A via vetorial é a principal forma de transmissão, especialmente por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, mas também pode acontecer por transfusão sanguínea e pelo contato sexual (Pielnaa *et al.*, 2020; Song *et al.*, 2017). A transmissão vertical pode ocorrer de modo intrauterino, via placenta, ou durante o parto, devido ao contato com secreções contaminadas (Gregory *et al.*, 2017; Zanluca; Noronha; Santos, 2018). Geralmente, as manifestações clínicas em adultos duram poucos dias e incluem febre, conjuntivite, cefaleia, mialgia, dor retro-orbital e erupções cutâneas (Basarab *et al.*, 2016). Mesmo que a maioria dos casos seja assintomática, a prevalência de indivíduos que não desenvolvem sintomas ainda não é conhecida (Haby *et al.*, 2018).

Embora o neurotropismo do ZIKV fosse reconhecido em camundongos desde a sua descrição (Dick, 1952), malformações congênitas relacionadas à infecção pelo ZIKV não foram identificadas após o primeiro grande surto epidêmico na Oceania, em 2007 (McCloskey; Endericks, 2017). No entanto, epidemias posteriores acenderam um alerta de preocupação internacional após a associação entre a infecção pelo ZIKV e a ocorrência de desordens neurológicas em adultos, como a síndrome de Guillain-Barré, e malformações craniofaciais congênitas em recém-nascidos (Basile; Kok; Dwyer, 2017). Apesar de limitado, um estudo retrospectivo de Cauchemez *et al.* (2016) demonstrou uma associação temporal entre casos de microcefalia e o surto epidêmico de ZIKV na Polinésia Francesa, entre 2013 e 2014. Durante a epidemia no Brasil, um aumento de nove vezes nos casos de microcefalia congênita foi relatado (Marinho *et al.*, 2016). Considerando as evidências disponíveis e as incertezas acerca das consequências da infecção pelo ZIKV, a Organização Mundial da Saúde declarou a situação uma “emergência de

saúde pública de importância internacional”, em fevereiro de 2016 (Heymann *et al.*, 2016).

Uma das complicações neurológicas relacionadas à infecção intrauterina mais reportadas é a microcefalia (Leão *et al.*, 2020), condição em que a circunferência da cabeça na região cefálica é menor do que o esperado conforme sexo, idade gestacional e etnia (Ticconi; Pietropolli; Rezza, 2016). Caracteristicamente, o córtex cerebral é a região do encéfalo mais afetada (Merfeld *et al.*, 2017; Xu; Xu, 2021). Contudo, cabe destacar que a infecção pelo ZIKV durante a gestação está associada a uma série de manifestações clínicas além da microcefalia, incluindo calcificações no tecido nervoso, ventriculomegalia, hipoplasia ou atrofia do córtex cerebral, do cerebelo e do tronco encefálico, artrogripose (malformação nas articulações) e anomalias oftalmológicas (Freitas *et al.*, 2020). Segundo Melo *et al.* (2016), este conjunto de condições é conhecido como síndrome congênita do vírus Zika (SCZ).

Além de uma alta taxa de mortalidade entre os nascidos vivos – 11,3 vezes maior em comparação aos nascidos sem a SCZ no Brasil (Paixão *et al.*, 2022), a exposição ao ZIKV *in utero* pode causar problemas de saúde não identificáveis ao nascer e que evoluem com o crescimento da criança, como atrasos no desenvolvimento neurocognitivo e deficiência visual (Faiçal *et al.*, 2019; Martinez *et al.*, 2023; Mulkey *et al.*, 2020). Levando em conta que a severidade das malformações está relacionada ao tempo de exposição ao ZIKV e que o primeiro trimestre de gestação é um período crítico à infecção (Gallo *et al.*, 2020; Mendes *et al.*, 2020), estes efeitos mais abrangentes, especialmente sobre o desenvolvimento de estruturas craniofaciais, podem resultar de alterações em vias moleculares que atuam no desenvolvimento embrionário inicial. Aprofundar os conhecimentos acerca dos impactos do ZIKV durante o desenvolvimento inicial do sistema nervoso, em especial do prosencéfalo (vesícula da qual deriva o córtex cerebral), é fundamental para compreender os efeitos observados em pacientes com a SCZ.

1.2 PADRONIZAÇÃO E DESENVOLVIMENTO DO PROSENCÉFALO

Conforme Bianchi (2018), após a neurulação são formadas três vesículas encefálicas a partir do tubo neural: o prosencéfalo, o mesencéfalo e o rombencéfalo.

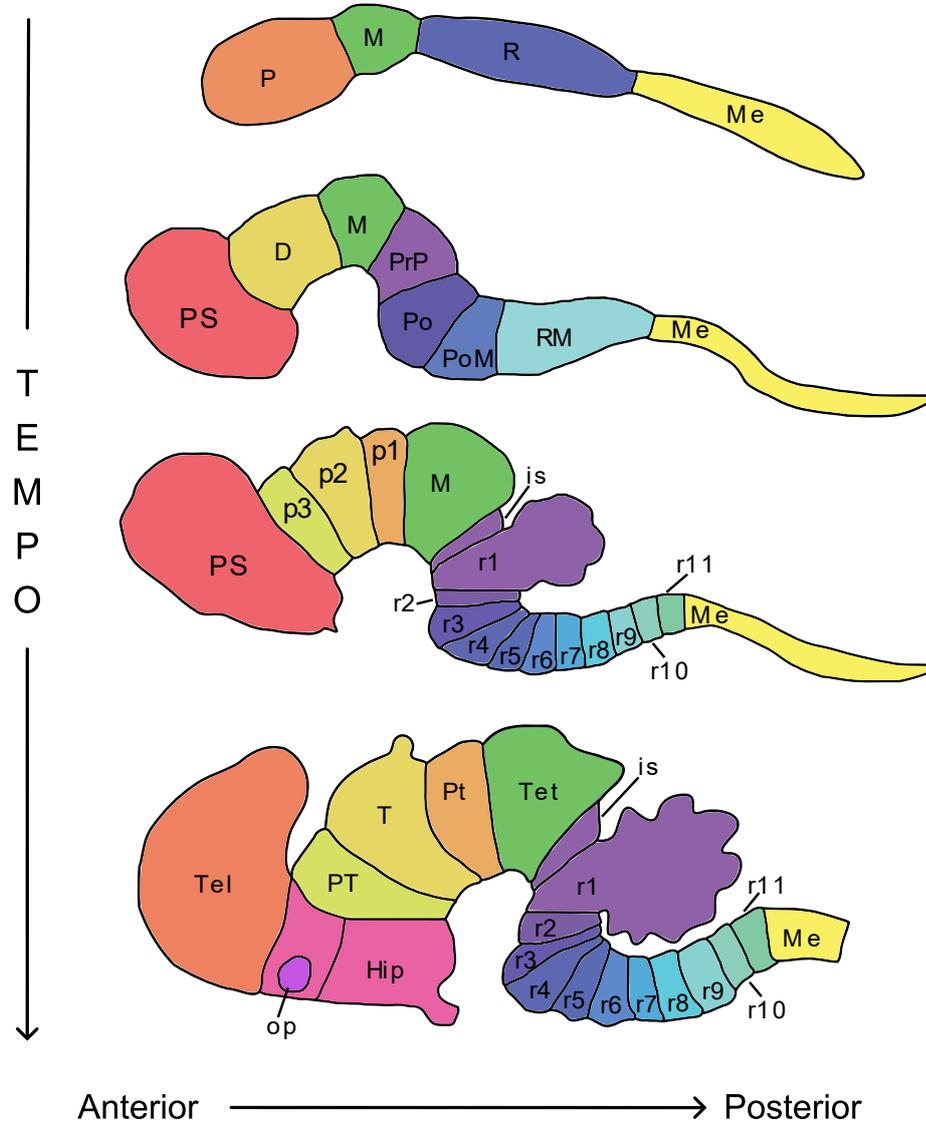
Segundo o modelo prosomérico³, o prosencéfalo se subdivide, posteriormente, em prosencéfalo secundário, que inclui o telencéfalo e o hipotálamo, e diencéfalo, no sentido rostro-caudal (Pombero; Martinez, 2009). A parte dorsal do telencéfalo (pálio) origina regiões corticais (e estruturas homólogas em não mamíferos), o bulbo olfatório e o claustro, por exemplo; e a parte ventral do telencéfalo (subpálio), dentre outras estruturas, forma os gânglios basais e a maior parte do septo (Medina, 2009). Conforme o mesmo modelo, derivam do diencéfalo o pré-teto, o tálamo, o epitálamo, o pré-tálamo e a eminência pré-talâmica (Puelles; Martinez, 2013). A Figura 1 ilustra a regionalização do encéfalo durante o desenvolvimento, do fechamento do tubo neural à formação das vesículas encefálicas e derivados, de acordo com o modelo prosomérico.

O desenvolvimento e a padronização do prosencéfalo dependem do controle molecular exercido cooperativamente por *SIX3*, *FGF8* e *FOXP1* (Tole; Hébert, 2020). Conforme Beccari, Marco-Ferreres e Bovolenta (2013), a expressão de *SIX3* é necessária para a especificação do prosencéfalo, por meio da repressão de *BMP4* e, posteriormente pela repressão de *WNT1*, ao desenvolvimento do telencéfalo. *SIX3* é um fator de transcrição que também participa na compartimentalização durante o desenvolvimento do diencéfalo, por meio de um mecanismo de repressão mútua com *IRX3* (Medina, 2009). Estudos de supressão gênica revelam que *SIX3* é necessário à expressão de *FGF8*, *FOXP1* e *NKX2.1* no telencéfalo (Lagutin *et al.*, 2003).

Secretado pelas células da borda neural anterior (ANR), *FGF8* é um morfógeno que atua na especificação e na regionalização do prosencéfalo, sendo necessário à indução e/ou à manutenção da expressão de *FOXP1* (Vieira *et al.*, 2010). O fator de transcrição *FOXP1* atua na padronização de territórios paliais e subpaliais e é considerado um regulador-mestre do desenvolvimento cerebral, especialmente devido a suas funções sobre o controle da proliferação celular e da diferenciação neural (Hou *et al.*, 2020; Kumamoto; Hanashima, 2017). Conforme Liu *et al.* (2018), *FOXP1* também atua no desenvolvimento de estruturas diencefálicas, como o epitálamo.

³ Distintamente da proposta de organização cerebral conhecida como “modelo colunar”, atualmente considerada obsoleta (Cf. Puelles, 2018).

Figura 1 – Representação esquemática da segmentação do tubo neural de um embrião murino, da formação das vesículas encefálicas primárias e da regionalização das principais estruturas derivadas



Fonte: elaborado pelo autor, baseado em Puelles *et al.* (2013) e Puelles (2018)

Legenda: D, diencéfalo; Hip, hipotálamo; is, istmo cerebral; M, mesencefalo; Me, medula espinal; op, pedículo óptico; P, prosencefalo; Po, região pontina; PoM, região pontino-medular; PrP, região pré-pontina; PS, prosencefalo secundário; Pt, pré-teto; PT, pré-tálamo; p1-3, prosômeros 1-3; R, rombencéfalo; RM, rombencéfalo medular; r1-11, rombômeros 1-11; T, tálamo; Tel, telencéfalo; Tet, teto

A formação do telencéfalo é particularmente dependente de *LHX2*, fator de transcrição envolvido na determinação do destino cortical das células progenitoras paliais (Chou *et al.*, 2009). Estudos em vertebrados indicam que a expressão de *LHX2* está sob o controle de *SIX3*, *FOXP1* e da via de sinalização FGF (Ando *et al.*, 2005; Godbole *et al.*, 2018; Seth *et al.*, 2006). Em mamíferos, por meio do controle da expressão de *HES1* e *CER1*, *LHX2* regula o balanço entre proliferação e

diferenciação dos progenitores neocorticais ao modular a atividade das vias de sinalização WNT e NOTCH (Chou; O'Leary, 2013; Chou; Tole, 2019; Hou *et al.*, 2013). HES1 é um fator de transcrição que mantém as células-tronco neurais num estado indiferenciado e proliferativo, por meio da repressão de genes pró-neurais, como *NEUROG2* e *ASCL1* (Dhanesh; Subashini; James, 2016). *NEUROG2* e *ASCL1* são fatores de transcrição expressos no telencéfalo dorsal e ventral, respectivamente, importantes controladores da diferenciação neuronal no sistema nervoso central (Imayoshi; Kageyama, 2014; Ware *et al.*, 2016). A expressão de *HES1* é classicamente associada à via de sinalização NOTCH, mas pode ser parcialmente controlada por *LHX2* (Chou; O'Leary, 2013; Kageyama; Shimojo; Imayoshi, 2015). Outro alvo direto de *LHX2*, *CER1* é uma molécula solúvel crucial para a formação da cabeça, que interage fisicamente com as proteínas BMP, WNT e NODAL e inibe a ativação dessas vias de sinalização (Correns *et al.*, 2021; Yanagita, 2005).

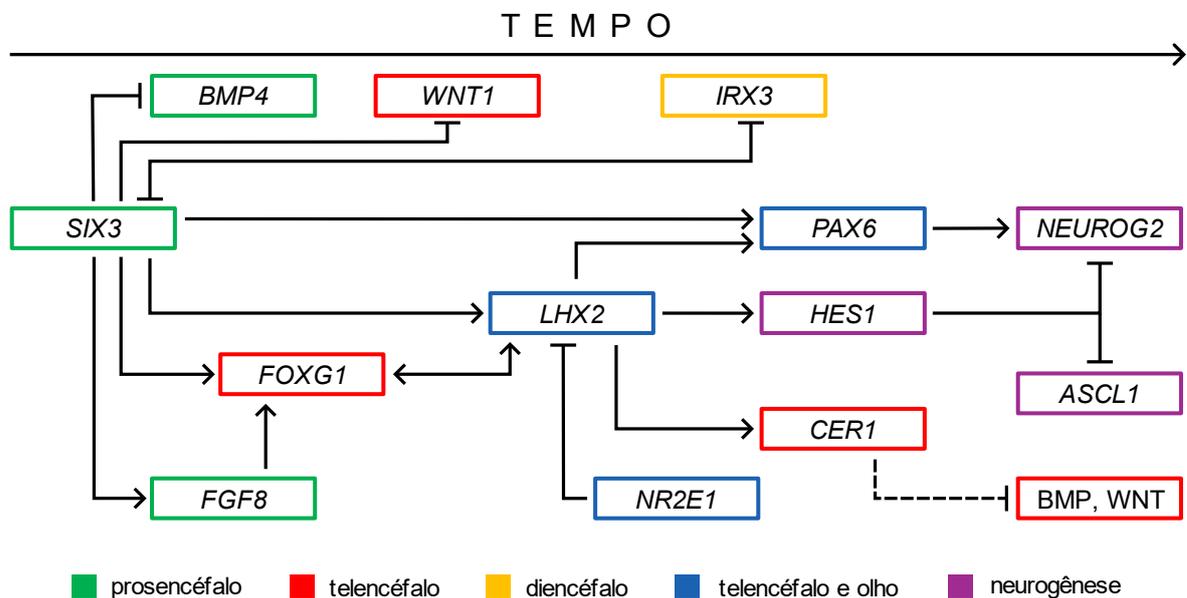
Outro fator de transcrição essencial à formação do telencéfalo é *NR2E1*, envolvido principalmente na manutenção das células progenitoras neurais num estado proliferativo e indiferenciado (Islam; Zhang, 2015). Assim como observado em embriões de camundongo nocauteados para *LHX2*, a perda de *NR2E1* também promove a diferenciação neuronal prematuramente (Chou; O'Leary, 2013; Roy *et al.*, 2004). Apesar das funções moleculares semelhantes, há evidências mostrando que *NR2E1* pode reprimir a expressão de *LHX2* (Schmouth *et al.*, 2015). Embora o controle da expressão de *NR2E1* ainda seja pouco compreendido, alguns estudos sugerem um papel regulatório exercido pelo fator de transcrição *SOX2* e pelos níveis de ácido retinoico (Islam; Zhang, 2015; Shimosaki *et al.*, 2012; Yu *et al.*, 2017).

Muitos dos genes envolvidos no desenvolvimento do telencéfalo e do diencéfalo também atuam no desenvolvimento dos olhos, incluindo *SIX3*, *LHX2* e *NR2E1* (Zuber *et al.*, 2003). Embriões de camundongo nocauteados para estes genes apresentam vários defeitos graves na formação dos olhos (Lagutin *et al.*, 2003; Porter *et al.*, 1997; Yu *et al.*, 2000). Conforme Yun *et al.* (2009), *LHX2* desempenha um papel central na coordenação do desenvolvimento ocular, regulando genes essenciais para a regionalização da vesícula óptica, no desenvolvimento da retina e da lente ocular. *SIX3* atua sobretudo na ativação de *PAX6*, considerado um regulador-mestre do desenvolvimento ocular (Singh; Tsonis, 2010). Também sob o controle transcricional de *LHX2*, *PAX6* é um fator de

transcrição envolvido na padronização do prosencéfalo e na especificação do neuroepitélio ocular (Georgala; Carr; Price, 2011; Hou *et al.*, 2013; Hsu *et al.*, 2015; Shaham *et al.*, 2012). Conforme Zuber *et al.* (2003), é provável que NR2E1 não esteja envolvido na especificação inicial dos tecidos que originarão os olhos, porque é expresso após a formação do campo ocular em *Xenopus*. As funções de NR2E1 no desenvolvimento do sistema visual são conhecidas a partir dos fenótipos observados em animais nocauteados para este gene, incluindo anomalias na formação e na vascularização da retina (Islam; Zhang, 2015). Segundo Wang e Xiong (2016), NR2E1 regula a proliferação e a diferenciação das células progenitoras retiniais.

A Figura 2 resume esquematicamente as principais relações moleculares entre os controladores da padronização e do desenvolvimento inicial do prosencéfalo, do telencéfalo, do diencéfalo e dos olhos.

Figura 2 – Representação esquemática das principais relações moleculares entre controladores da padronização e do desenvolvimento iniciais do prosencéfalo, do telencéfalo, do diencéfalo e dos olhos



Fonte: elaborado pelo autor, baseado em Beccari, Marco-Ferreres e Bovolenta (2013), Gestri *et al.* (2005), Lagutin *et al.* (2003), Geng *et al.* (2016), Kobayashi *et al.* (2002), Shimamura e Rubenstein (1997), Liu *et al.* (2006), Ando *et al.* (2005), Godbole *et al.* (2018), Mangale *et al.* (2008), Hou *et al.* (2013), Chou e O'Leary (2013), Schmouth *et al.* (2015), Scardigli *et al.* (2003), Wilkinson, Dennis e Schuurmans (2013) e Piccolo *et al.* (1999)

Legenda: linhas contínuas indicam relações entre proteínas e genes; linhas pontilhadas indicam relações entre proteínas (indução →; repressão/bloqueio ←)

Conforme Wen, Song e Ming (2017), a ação fisiopatológica do ZIKV poderia ocorrer por meio de mecanismos celulares autônomos, diretamente sobre os progenitores neurais, e não autônomos, sobre células placentárias, gliais ou microgлияis. De forma geral, a explicação predominante para a neuropatogênese induzida pelo ZIKV, especialmente em relação ao fenótipo microcefálico, envolve desregulação do ciclo celular, efeitos secundários da resposta imunológica e morte celular, sobretudo apoptose (Komarasamy *et al.*, 2022). Entretanto, o conjunto de condições clínicas compreendidas pela SCZ indicam que o ZIKV pode afetar o desenvolvimento de outras estruturas craniofaciais além do córtex cerebral, formado a partir do telencéfalo. Trabalhos anteriores do grupo de pesquisa em modelo vertebrado demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode impactar a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento craniofacial, como FGF8, SHH, SIX1 e SIX2 (Souza, 2022; Taufer, 2023). Dessa forma, a hipótese deste trabalho é que o ZIKV perturbe vias moleculares sob o controle de SIX3 envolvidas na padronização e no desenvolvimento inicial do prosencéfalo e estruturas derivadas, incluindo o telencéfalo, o diencéfalo e os olhos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Investigar os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre vias moleculares e aspectos morfológicos relacionados à padronização e ao desenvolvimento do prosencéfalo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Avaliar os impactos da exposição ao ZIKV sobre a expressão de genes que controlam o desenvolvimento do prosencéfalo, como *SIX3*, *FOXP1*, *LHX2* e *NR2E1*;
- b) Investigar se a infecção pelo ZIKV causa alterações morfológicas no desenvolvimento inicial do telencéfalo e do diencéfalo;
- c) Analisar os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre o desenvolvimento das regiões palial e subpalial do telencéfalo;
- d) Caracterizar alterações morfológicas associadas à infecção pelo ZIKV no desenvolvimento ocular;
- e) Identificar possíveis alvos moleculares relacionados aos fenótipos apresentados por pacientes portadores da SCZ e associados ao desenvolvimento craniofacial por meio de análises computacionais usando dados de expressão gênica.

3 METODOLOGIA

Os procedimentos experimentais foram executados nas dependências do Laboratório de Células-Tronco e Regeneração Tecidual (LACERT), na Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC). Etapas da pesquisa envolvendo manipulação viral foram realizadas em sistema de contenção biológica em sala com nível de biossegurança 2 (NB-2), certificada pela Comissão Interna de Biossegurança da UFSC (CIBio/UFSC; extensão de CQB número 101/99). Os ensaios experimentais envolvendo o uso de animais vertebrados foram avaliados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais da UFSC (CEUA/UFSC; número de protocolo 6016021017).

Cabe destacar que neste trabalho foi utilizado material biológico previamente preparado pelo grupo de pesquisa. Os procedimentos de inoculação viral *in ovo*, coleta dos embriões, extração e dosagem de RNA, quantificação viral e avaliação da expressão de alguns genes dos grupos ZIKV-E3 e respectivo controle foram realizados anteriormente (Cf. Souza, 2022; Taufer, 2023).

3.1 DESENHO EXPERIMENTAL

O estudo foi executado com os seguintes grupos experimentais independentes: (i) grupo ZIKV-E3 – ovos incubados por dois dias, injetados com 1 μ L ou 2 μ L de solução contendo ZIKV (a 500 PFU/ μ L) e abertos um dia após a inoculação, no terceiro dia de incubação (E3); (ii) grupo ZIKV-E5 – ovos incubados por dois dias, injetados com 3 μ L de solução contendo ZIKV (a 100 PFU/ μ L) e abertos três dias após a inoculação, no E5. A cada um dos grupos experimentais foi designado um grupo controle, com ovos incubados por dois dias, injetados, respectivamente, com 1 μ L ou 3 μ L de solução salina tamponada (PBS) sem ZIKV e abertos conforme o grupo experimental que acompanham, no E3 ou no E5. A quantidade de vírus inoculada nos ovos do grupo ZIKV-E3 foi de 500 ou 1000 unidades formadoras de placa (PFU); e nos ovos do grupo ZIKV-E5 foi de 300 PFU. Segundo Taufer (2023), a carga viral final de cada embrião do grupo ZIKV-E3 independe da quantidade de vírus inicialmente inoculada (500 ou 1000 PFU de ZIKV); por isso, as amostras foram analisadas como um grupo único.

Os experimentos para os grupos ZIKV-E3 e respectivo controle foram realizados com ovos fertilizados de *Gallus gallus* (Linnaeus, 1758), doados pelo Biotério de Avicultura da Fazenda Experimental da Ressacada, no Centro de Ciências Agrárias (CCA) da UFSC. Para os experimentos dos grupos ZIKV-E5 e controle foram usados ovos fertilizados de *G. gallus* doados pela empresa Granja Faria S.A., de Lauro Müller, SC. Até o momento da incubação, os ovos foram armazenados sob refrigeração, a 18 °C.

Os ensaios foram realizados com a cepa ZV BR 2015/15261⁴ de ZIKV (*Orthoflavivirus zikaense*), isolada na região Nordeste do Brasil a partir de uma pessoa infectada, em junho de 2015 (Strottmann *et al.*, 2019). Alíquotas dessa cepa de ZIKV foram doadas pela Dra. Claudia Nunes Duarte dos Santos, do Instituto Carlos Chagas/Fundação Oswaldo Cruz (ICC/Fiocruz), e pelo prof. Dr. Daniel Santos Mansur, do Laboratório de Imunobiologia da UFSC.

3.2 INOCULAÇÃO *IN OVO* E COLETA DOS EMBRIÕES

Como descrito por Souza (2022) e Taufer (2023), os ovos foram incubados com a câmara de ar voltada para cima, a 38 °C, sob ventilação forçada constante e umidade relativa do ar de aproximadamente 65 % em incubadora comercial (ChocMais), por dois dias. No segundo dia de incubação (E2), os ovos foram retirados da incubadora e, a partir de uma abertura na casca do ovo na região da câmara de ar, as membranas extraembrionárias foram perfuradas e o inóculo foi injetado no dorso do embrião, próximo à vesícula ótica. Os procedimentos de injeção foram realizados em cabine de segurança biológica, usando estereomicroscópio (Olympus SZ61). A abertura na casca do ovo foi selada com fita adesiva atóxica e os ovos foram realocados na incubadora até o E3 ou o E5, a depender do grupo experimental.

Decorrido o tempo de incubação, conforme o grupo experimental, todos os ovos foram retirados da incubadora e abertos com o auxílio de tesoura e pinças cirúrgicas. Embriões vivos no momento da abertura do ovo foram coletados, transferidos para uma placa de Petri contendo PBS e as estruturas extraembrionárias foram removidas. Em seguida, os embriões do grupo ZIKV-E3 e

⁴ Depositado no banco de dados de sequências de nucleotídeos GenBank (Clark *et al.*, 2016) sob o número de acesso MF073358.1.

do respectivo grupo controle foram fotografados e armazenados a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até a extração de RNA (Cf. Souza, 2022; Taufer, 2023). Embriões do grupo ZIKV-E5 e do grupo controle tiveram as cabeças cortadas, na altura do segundo arco faríngeo, e fixadas em formaldeído a 4 % em PBS, para registro fotográfico e processamento posterior; o corpo foi imediatamente alocado em microtubo de plástico contendo o reagente TRIzol (Invitrogen), para extração de RNA mais tarde.

3.3 EXTRAÇÃO E DOSAGEM DE RNA E QUANTIFICAÇÃO VIRAL

O RNA total dos embriões do grupo ZIKV-E3 e do respectivo grupo controle foi extraído utilizando o *kit* comercial *RNeasy Mini Kit* (Qiagen), seguindo as orientações do fabricante com adaptações (Souza, 2022; Taufer, 2023). O RNA dessas amostras foi quantificado em espectrofotômetro Picodrop, utilizando o programa do equipamento. O RNA total dos corpos dos embriões do grupo ZIKV-E5 e do respectivo grupo controle foi extraído utilizando o método fenol-clorofórmio com o reagente TRIzol (Invitrogen), conforme as instruções do fabricante. O RNA dos embriões destes grupos foi quantificado em *Qubit 4 Fluorometer* (Invitrogen), seguindo as orientações do fabricante. Após a extração, o RNA dos embriões foi armazenado em microtubos de plástico a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

A presença de ZIKV nos embriões inoculados *in ovo* foi confirmada pela quantificação da carga viral nas amostras de RNA extraído usando a técnica de transcrição reversa seguida da reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR). Para essa análise foi utilizado o *kit* comercial *GoTaq Probe 1-Step RT-qPCR System* (Promega), por meio de iniciadores específicos (*primers*) e a sonda de hidrólise ZIKV 1107-FAM (Lanciotti *et al.*, 2008). Como detalhado por Taufer (2023), a carga viral individual foi calculada tendo como referência uma curva padrão, em duplicata, de uma amostra de RNA viral purificado (na diluição de 1:500), doada pelo prof. Dr. Daniel S. Mansur.

3.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO GÊNICA

As análises de expressão gênica foram realizadas apenas com amostras do grupo ZIKV-E3 e do grupo controle, também por meio da técnica de RT-qPCR. Como descrito por Taufer (2023), para estas análises foi usado o *kit* comercial

GoTaq 1-Step RT-qPCR System (Promega) utilizando o termociclador *QuantStudio 3 Real-Time PCR System* (Applied Biosystems) e o programa do equipamento (*Design and Analysis*, versão 1.5.2).

A Tabela 1 apresenta os iniciadores específicos para os genes avaliados nas análises de expressão gênica. Os iniciadores foram desenhados a partir de sequências depositadas no banco de dados do *National Center for Biotechnology Information* (Sayers *et al.*, 2024), por meio das ferramentas Primer BLAST (Ye *et al.*, 2012) e BLAST (Camacho *et al.*, 2009). A expressão de cada gene foi determinada pelo modelo matemático proposto por Pfaffl (2001), usando a expressão de *MRPS27* como referência (Cf. Nascimento *et al.*, 2015). A eficiência dos iniciadores foi calculada conforme apresentado por Taufer (2023).

Tabela 1 – Especificações dos iniciadores utilizados nas análises de expressão gênica

| Genes | Sequência dos iniciadores (3' → 5') | Tm (°C) | Ra (pb) | Ef (%) |
|----------------|---|----------------|---------|--------|
| <i>CER1</i> | F: AACTTGCAGAACCCTGCCTT R: CTGGACCAGGAACATGAAAGGA | 60,11 59,96 | 116 | 109,46 |
| <i>FOXG1</i> | F: TCCCCTACGCCACTCACCAC R: GTCTGTCCCGCCAGGAGGTT | 63,70 63,99 | 127 | 113,46 |
| <i>HES1</i> | F: GGAGATGACCGTCAAGCACCT R: CTTCGTTTCATGCACTCGCTGA | 62,11 61,26 | 119 | 110,81 |
| <i>LHX2</i> | F: AAActCAACCTGGAGTCCGA R: CCAGGTGACATCTCGCACAT | 58,58 60,11 | 112 | 111,39 |
| <i>NEUROG2</i> | F: GTGTTGTTAGGGGTCCAGGT R: TCCTTTTGATAGAGAGTTCAGCC | 59,23 57,91 | 102 | 103,73 |
| <i>NR2E1</i> | F: CTACGTCTGCAAGTCGGGAA R: GCACAGCGTCTTTGTTTCATGT | 59,76 60,00 | 119 | 113,28 |
| <i>SIX3</i> | F: ATTTGGGATGGCGAGCAGAA R: AACCAGTTGCCTACTTGCGT | 60,03 60,18 | 155 | 106,91 |
| <i>MRPS27</i> | F: TAACCCTGACCACCCAATC R: GCTTGTTCTTGCTCCCACTC | 58,94 59,12 | 103 | 105,18 |

Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: F, iniciador *forward*; R, iniciador *reverse*; Tm, temperatura de *melting*; Ra, tamanho da região amplificada; Ef, eficiência dos iniciadores calculada

3.5 REGISTRO FOTOGRÁFICO E PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Numa placa de Petri com uma camada de agarose no fundo contendo PBS, as cabeças dos embriões dos grupos ZIKV-E5 e controle foram fotografadas usando estereomicroscópio (Olympus SZ61), por meio do sistema de captura acoplado

(Olympus SC30) e com o programa *analySIS getIT*, versão 5.1 (Olympus). Estas imagens foram usadas nas análises morfométricas posteriores.

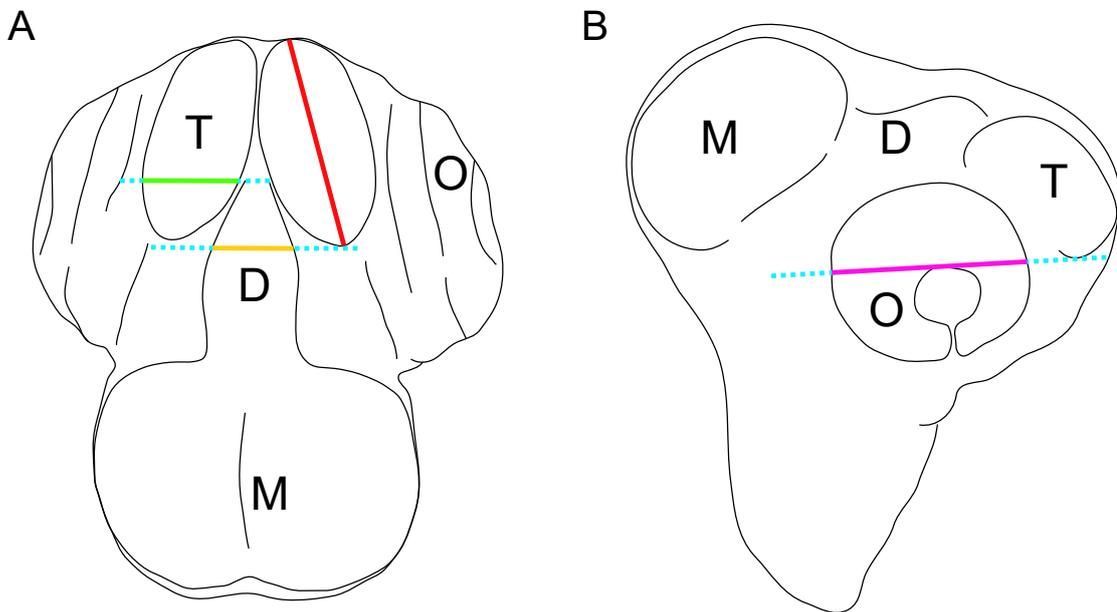
Subsequentemente, as cabeças dos embriões dos grupos ZIKV-E5 e controle foram processadas para a execução de cortes histológicos. Os tecidos fixados foram lavados em PBS e depois passaram por uma série crescente de etanol (a 10, 20, 40, 80 e 100 %) em água ultrapura, por 15 min, sob agitação leve; em seguida, passaram por uma solução de xilol e etanol (1:1), seguido de dois banhos de xilol, por 15 min cada. Depois, os embriões foram embebidos em parafina a 57 °C e deixados até o dia seguinte (entre 12 e 18 h). No dia seguinte, passaram à segunda embebição em parafina, por pelo menos 2 h, a mesma temperatura. Posteriormente, as cabeças foram alocadas em formas com parafina derretida e posicionadas na orientação desejada.

Depois da parafina esfriar, os blocos foram removidos das formas e seções no plano coronal de 10 µm, da região anterior para posterior (do telencéfalo ao diencéfalo), foram produzidas em micrótomo rotativo manual (Leica RM2125RT). As seções foram alocadas em lâminas histológicas e deixadas secando até o dia seguinte (entre 12 e 18 h), a 36 °C. Após a remoção da parafina em dois banhos de xilol, por 5 min, as lâminas com os cortes histológicos foram banhadas em concentrações decrescentes de etanol (a 100, 95, 70 e 50 %) em água ultrapura, depois apenas em água ultrapura e, por fim, em PBS, também por 5 min em cada solução. Na sequência, as lâminas histológicas com os cortes foram cobertas com glicerol e lamínula. As lâminas montadas foram observadas em microscópio de luz (Olympus BX41) e fotografadas por meio do sistema de captura acoplado (Olympus SC30), usando o programa *analySIS getIT*, versão 5.1 (Olympus).

3.6 AVALIAÇÃO MORFOMÉTRICA

Usando imagens da cabeça inteira, o comprimento e a largura do telencéfalo, a largura do diencéfalo e o diâmetro dos olhos, como mostrado na Figura 3, foram mensurados utilizando o programa Fiji, versão 2.14.0 (Schindelin *et al.*, 2012). Estruturas pareadas como o telencéfalo e os olhos foram medidas em ambos os hemisférios da cabeça e a média aritmética simples foi usada nas análises estatísticas.

Figura 3 – Representação esquemática da cabeça de um embrião de galinha com cinco dias de idade em vista superior e de perfil, mostrando as estruturas mensuradas e o método de mensuração



Fonte: elaborado pelo autor

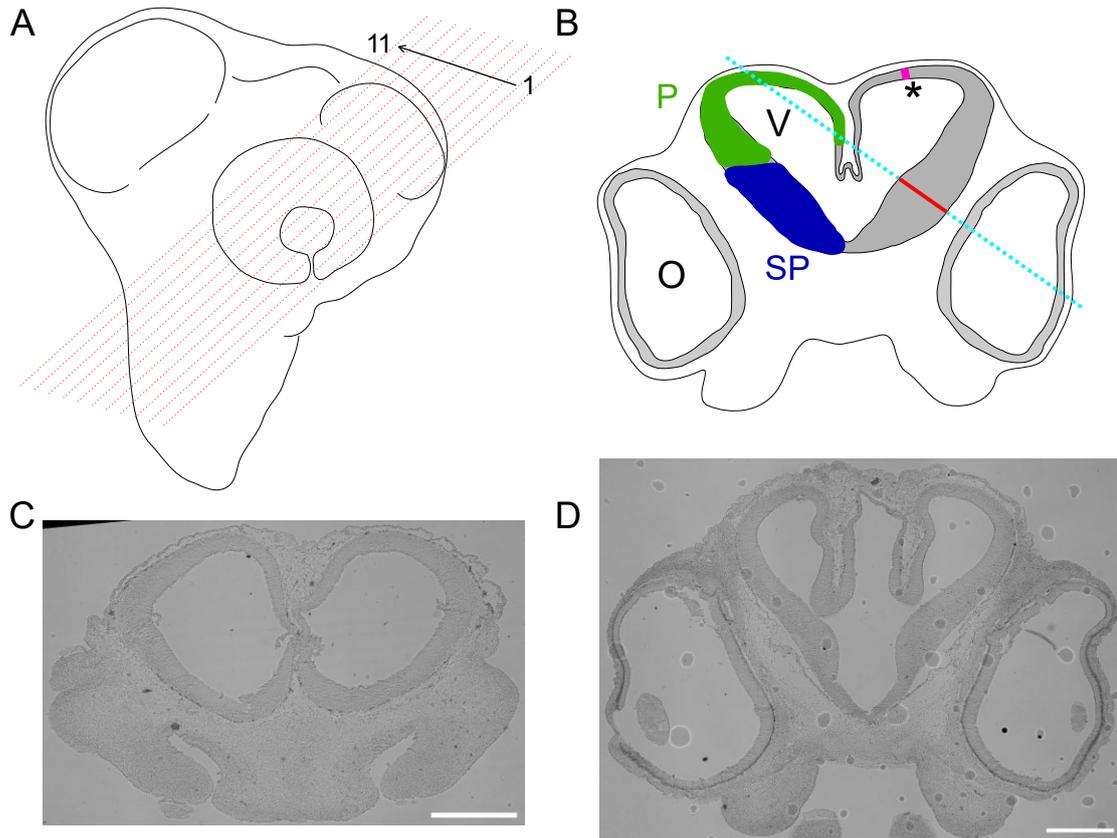
Legenda: A – vista superior, mensuração da largura (linha verde) e do comprimento (linha vermelha) do telencéfalo, e da largura do diencéfalo (linha laranja); B – vista de perfil, mensuração do diâmetro do olho (linha rosa); as linhas pontilhadas em azul claro serviram de referência para fazer as medidas; T, telencéfalo; D, diencéfalo; M, mesencéfalo; O, olho

As imagens dos cortes histológicos foram usadas para mensurar a espessura da parede do telencéfalo, nas regiões que compreendem o pálido dorsal e o subpálido (Figura 4B). Estas estruturas foram medidas em ambos os hemisférios da cabeça e a média aritmética simples foi usada nas análises estatísticas. Devido ao tamanho das estruturas e ao campo de captura do equipamento, diferentes fotografias parcialmente sobrepostas precisaram ser remontadas para formar uma imagem completa; isso foi realizado usando o algoritmo *Stitching* (Preibisch; Saalfeld; Tomancak, 2009), disponível como plugin no programa Fiji.

Foram realizadas medidas sucessivas ao longo do eixo ântero-posterior do telencéfalo, em posições numeradas de 1 a 11, com cerca de 65 μm de distância entre cada uma, como mostrado na Figura 4A. Como apresentado nas Figuras 4C e 4D, o ponto 1 de cada cabeça corresponde a uma região rostral do telencéfalo em que o septo que divide os hemisférios telencefálicos ainda é visível; e o ponto 11 representa uma região mais posterior do telencéfalo, por volta da primeira metade do diencéfalo. Foram usados nas análises estatísticas somente dados das posições

com pelo menos três cortes para cada grupo experimental, controle (n = 3 embriões) e infectado pelo ZIKV (n = 5 embriões).

Figura 4 – Representações esquemáticas da cabeça de um embrião de *G. gallus* com cinco dias de idade, mostrando a posição relativa dos cortes histológicos, o método de mensuração e imagens representativas das posições 1 e 11



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: A – esquema da cabeça de um embrião de cinco dias mostrando as posições relativas dos cortes histológicos; B – esquema de um corte histológico na posição 5, mostrando o método de mensuração da espessura da parede do telencéfalo na região do pálio dorsal (linha rosa, asterisco) e do subpálio (linha vermelha); a linha pontilhada em azul claro serviu de referência para fazer a medida do subpálio; P, pálio (verde); SP, subpálio (azul); O, olho; V, ventrículo; C-D – imagens representativas de cortes nas posições 1 e 11 de um embrião do grupo controle, respectivamente; barra de escala: 500 µm

3.7 ANÁLISES COMPUTACIONAIS DE INTERAÇÕES ENTRE GENES E PROTEÍNAS

Para compreender melhor as vias moleculares possivelmente afetadas pelo ZIKV, foi realizada uma análise integrativa de correlação entre dados de expressão de 24 genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial coletados pelo grupo de pesquisa. Este conjunto próprio conta com dados de 23 embriões do grupo controle e 72 embriões infectados pelo ZIKV com três dias de idade (grupo ZIKV-E3), com a

carga viral quantificada individualmente. A partir dessa análise foram selecionados genes com alta correlação no grupo controle ($\rho > 0,5$ e $p < 0,05$) e ausência de correlação significativa no grupo infectado ($p \geq 0,05$).

A lista de genes resultante foi usada para identificar relações intergênicas e interações entre proteínas. A análise de predição das relações entre genes foi realizada por meio da plataforma GeneMANIA (Franz *et al.*, 2018), um banco de dados de interações baseadas no aspecto funcional dos genes. A análise computacional de interações proteicas foi executada usando o banco de dados STRING Database, versão 12.0 (Szklarczyk *et al.*, 2023). Em ambos os casos, foram consideradas as informações das plataformas para a espécie humana e os gráficos resultantes foram gerados pelas próprias plataformas virtuais.

3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados estatisticamente com a ferramenta computacional R (R Core Team, 2024), por meio do programa de desenvolvimento integrado RStudio (Posit Team, 2024). Os pacotes para R *dplyr* (Wickham *et al.*, 2023a), *rio* (Chan *et al.*, 2023), *tidyr* (Wickham; Vaughan; Girlich, 2024), *magrittr* (Bache; Wickham, 2022) e *metan* (Olivoto; Lúcio, 2020) foram usados para manipulação e processamento dos dados; *ggplot2* (Wickham, 2016), *patchwork* (Pedersen, 2024), *ggpubr* (Kassambara, 2023a) e *svglite* (Wickham *et al.*, 2023b) foram utilizados para visualização de dados e elaboração dos gráficos. Testes estatísticos não implementados no ambiente básico do R foram usados por meio dos pacotes *RVAideMemoire* (Herve, 2023) e *rstatix* (Kassambara, 2023b).

A normalidade dos dados foi verificada pelo teste de Shapiro-Wilk, por grupo experimental (Torman; Coster; Riboldi, 2012). Conforme Wilcox (2017), dados com distribuição normal e variâncias estatisticamente iguais foram comparados entre si pelo teste t de Student (não pareado); no caso de heteroscedasticidade, foi usado o teste t de Welch; dados sem distribuição normal foram analisados pelo teste de Mann-Whitney. A comparação da variância dos dados para dois grupos foi verificada pelo teste F (Schumacker; Tomek, 2013).

Por ser um teste mais robusto a valores discrepantes (Schober; Boer; Schwarte, 2018), a correlação dos dados foi avaliada usando o coeficiente de correlação de postos de Spearman (ρ), seguindo a interpretação dos coeficientes de

correlação apresentada por Vieira (2016). Em seguida, foi realizada uma análise de regressão linear simples. Para as análises de correlação com a carga viral dos embriões, os dados do grupo controle foram desconsiderados.

A análise estatística da distribuição de conjuntos de dados foi realizada usando o teste de Kolmogorov-Smirnov para duas amostras (Pratt; Gibbons, 1981; Wilcox, 2022).

Amostras do grupo ZIKV-E5 com carga viral relativa menor que 1 PFU não foram consideradas nas análises. Os dados de carga viral foram transformados pelo cálculo do logaritmo de base 10 (\log_{10}), devido à grande amplitude entre os valores; este resultado foi usado nas análises de correlação para facilitar a visualização.

Para todos os testes foi adotado o nível de significância de 5 % de probabilidade de erro. Conforme Karch (2023), valores discrepantes não foram removidos dos conjuntos de dados.

4 RESULTADOS

Para analisar os possíveis impactos da infecção pelo ZIKV no desenvolvimento de estruturas derivadas do prosencéfalo, foram conduzidos experimentos com embriões de *G. gallus* em diferentes idades.

Primeiramente, foi avaliada a expressão de genes cruciais ao desenvolvimento do prosencéfalo e estruturas derivadas. Em seguida, foram analisados os possíveis efeitos da infecção pelo ZIKV sobre a morfologia do telencéfalo, do diencéfalo e dos olhos. Adicionalmente, conduziu-se um estudo integrativo com todos os dados de expressão gênica disponíveis e análises computacionais, a fim de compreender melhor as vias moleculares potencialmente afetadas pelo ZIKV.

Neste estudo, foram utilizados dados de trabalhos anteriores conduzidos pelo grupo de pesquisa.

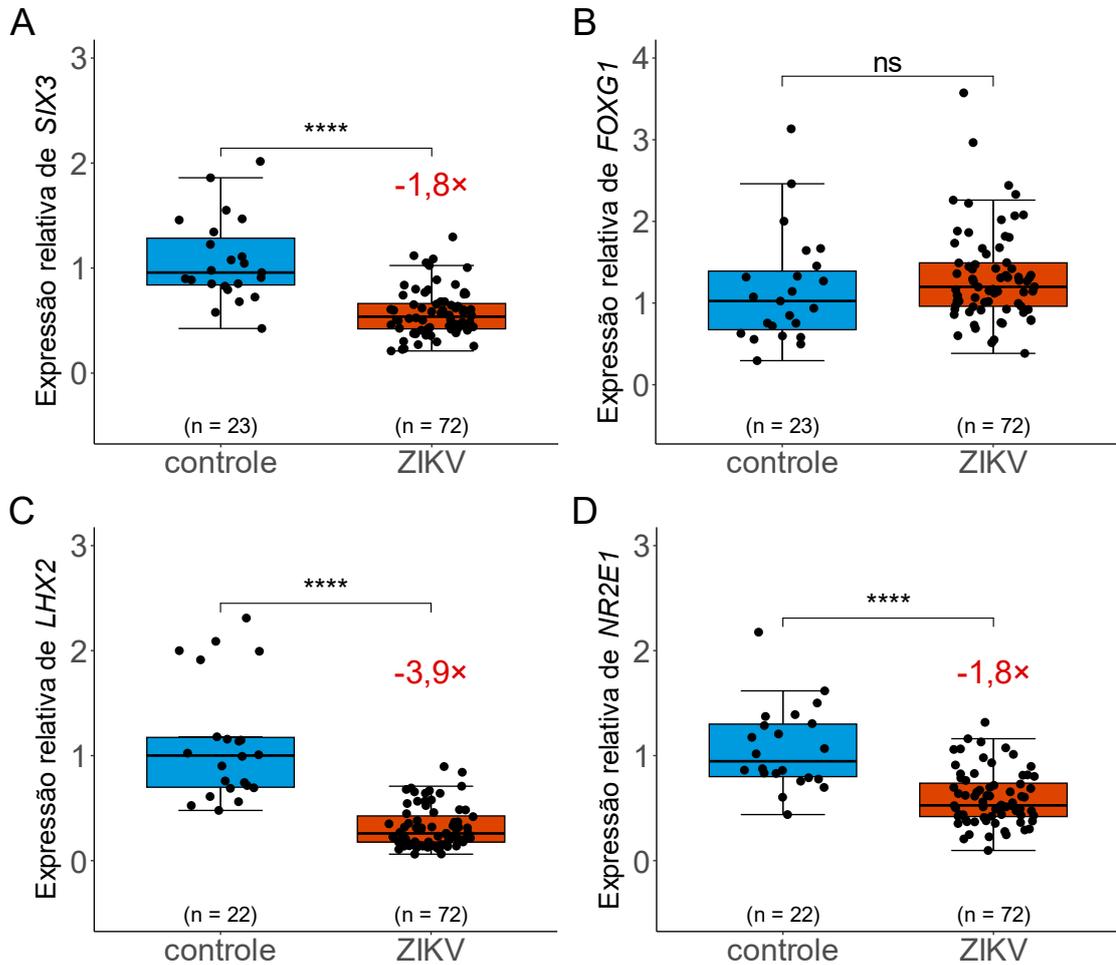
4.1 A EXPOSIÇÃO AO ZIKV REDUZ A EXPRESSÃO DE GENES RELACIONADOS AO DESENVOLVIMENTO DO PROSENCÉFALO

Considerando as manifestações clínicas apresentadas por pacientes portadores da SCZ relacionadas ao desenvolvimento craniofacial, foi analisada a expressão de genes relacionados à padronização e ao desenvolvimento do prosencéfalo e de estruturas derivadas, tidos como possíveis alvos moleculares do ZIKV.

Como mostrado na Figura 5, os níveis de expressão de *SIX3* (-1,8×; $p < 0,0001$), de *LHX2* (-3,9×; $p < 0,0001$) e de *NR2E1* (-1,8×; $p < 0,0001$) foram regulados negativamente em embriões de três dias expostos ao ZIKV por apenas 24 h. Curiosamente, a expressão de *FOXP1*, um dos principais controladores do desenvolvimento do sistema nervoso central, não foi significativamente afetada pela infecção viral ($p = 0,102$; Figura 5B).

Os níveis de expressão de *SIX3*, *LHX2*, *NR2E1* e *FOXP1* não foram correlacionados de modo estatisticamente significativo com a quantidade de ZIKV nas amostras.

Figura 5 – Nível de expressão gênica relativa de *SIX3*, *FOXG1*, *LHX2* e *NR2E1* em embriões de *G. gallus* com três dias de idade dos grupos controle e infectado



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: A-D – os gráficos apresentam a mediana de cada grupo; **** $p < 0,0001$; ns $p \geq 0,05$; os dados de expressão gênica de *FOXG1* foram coletados previamente a este trabalho

Considerando o efeito acentuado da infecção pelo ZIKV na expressão de *LHX2*, assim como suas funções no controle do balanço entre proliferação celular e diferenciação neuronal, a expressão de genes-alvo de *LHX2* foi avaliada.

4.2 A EXPRESSÃO DE GENES-ALVO DE *LHX2* É ALTERADA PELO ZIKV

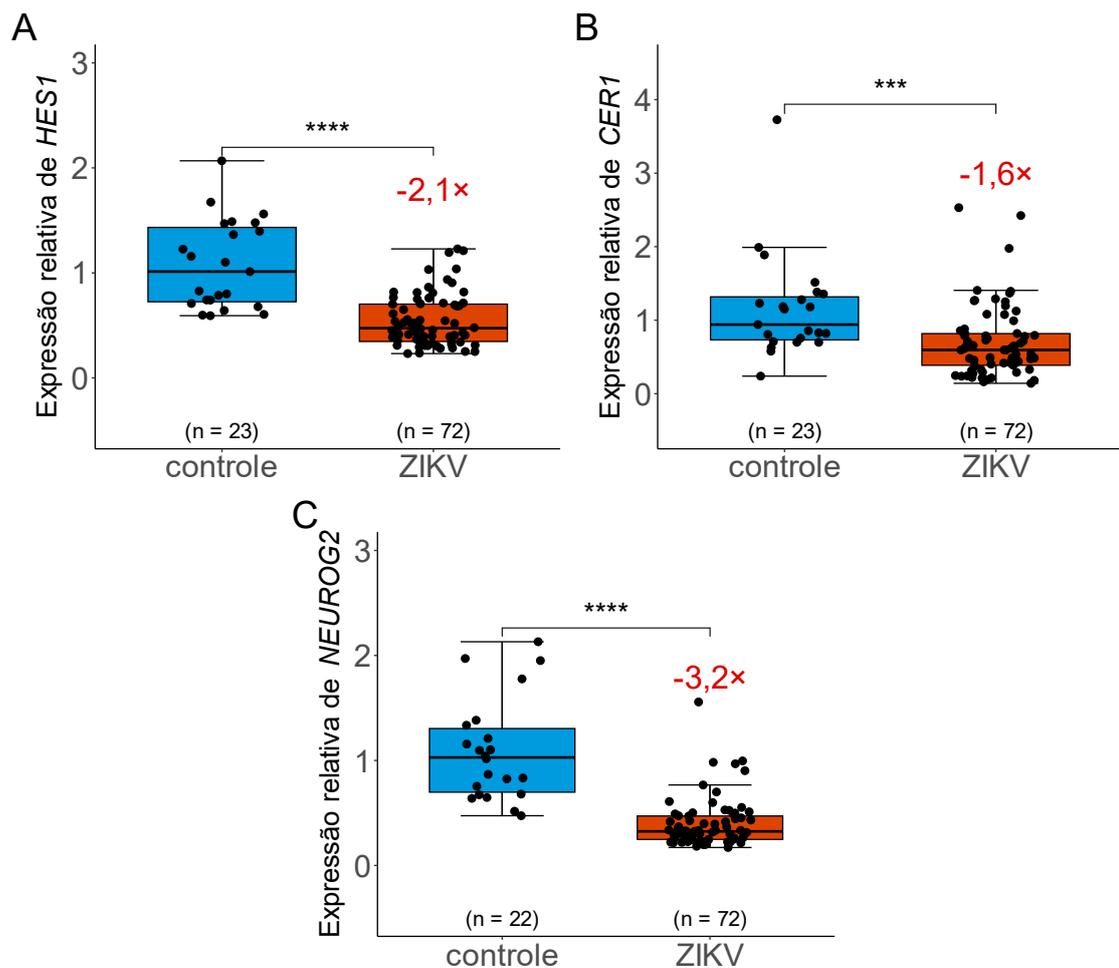
O fator de transcrição *LHX2* é um importante controlador do desenvolvimento do telencéfalo, atuando sobre o balanço entre proliferação celular e diferenciação neuronal. Considerando o impacto da infecção pelo ZIKV na expressão de *LHX2*, foram analisados alguns de seus genes-alvo, como *HES1* e *CER1*. *HES1* é um fator de transcrição envolvido no controle da proliferação de

progenitores neurais e *CER1* é um fator solúvel, produzido por células epiteliais, que bloqueia a ativação das vias de sinalização molecular BMP, WNT e NODAL.

Como mostrado na Figura 6, foi constatada redução significativa na expressão de *HES1* (-2,1×; $p < 0,0001$) e *CER1* (-1,6×; $p < 0,001$). Levando em conta que a diminuição de *LHX2* pode promover prematuramente a diferenciação neuronal, foi avaliada a expressão de *NEUROG2*, um importante fator de transcrição envolvido no controle da neurogênese no sistema nervoso central. Notavelmente, a infecção pelo ZIKV também regulou de modo negativo a expressão de *NEUROG2* (-3,2×; $p < 0,0001$; Figura 6C).

Também não foi verificada correlação estatisticamente significativa entre os níveis de expressão de *HES1*, *CER1* e *NEUROG2* e a carga de ZIKV por amostra.

Figura 6 – Nível de expressão gênica relativa de *HES1*, *CER1* e *NEUROG2* em embriões de *G. gallus* com três dias de idade dos grupos controle e infectado



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: A-C – os gráficos apresentam a mediana de cada grupo; **** $p < 0,0001$; *** $p < 0,001$

Em razão dos impactos da infecção pelo ZIKV sobre a expressão de genes associados ao desenvolvimento do prosencéfalo, procedeu-se à análise morfológica das vesículas encefálicas derivadas dessa estrutura, telencéfalo e diencéfalo, em embriões com cinco dias de idade.

4.3 A INFECÇÃO PELO ZIKV IMPACTA O PADRÃO DE CRESCIMENTO DO TELENCEFALO

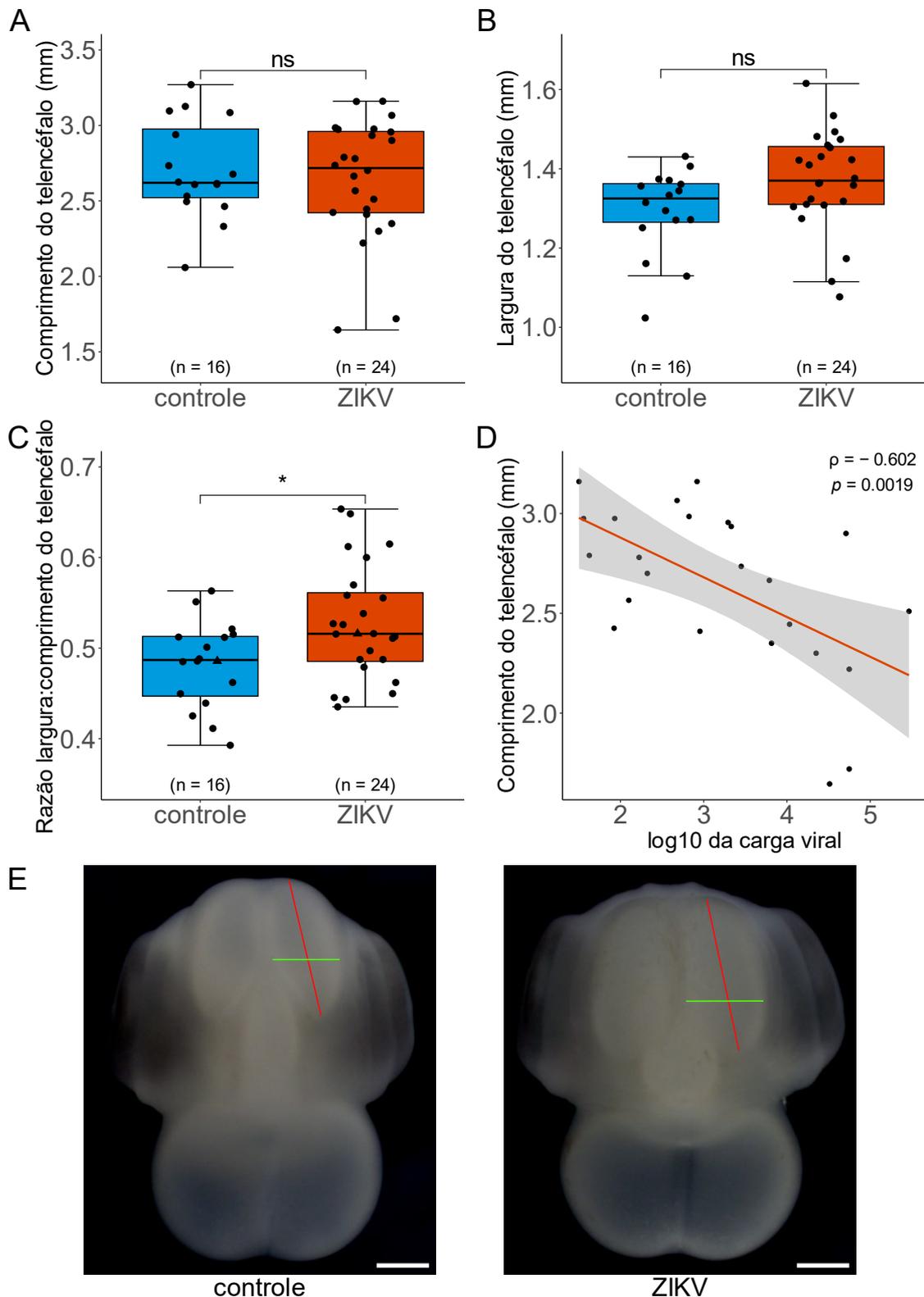
Em seguida, foram realizadas avaliações dos possíveis efeitos sobre a morfologia de embriões com cinco dias de idade. Essa idade embrionária foi escolhida por representar um momento no qual os impactos observados na expressão dos genes avaliados em embriões de três dias poderiam ter efeitos mensuráveis sobre a morfologia do sistema nervoso central.

As análises morfométricas não demonstraram diferenças estatisticamente significativas entre os grupos controle e infectado com relação ao comprimento ($p = 0,804$) e à largura ($p = 0,054$) do telencéfalo (Figuras 7A e 7B). Contudo, observou-se que a mediana da largura do telencéfalo foi numericamente maior em embriões infectados. Como mostrado na Figura 7C, a razão entre a largura e o comprimento do telencéfalo foi significativamente maior em embriões infectados ($p < 0,05$). Este resultado pode indicar um efeito da infecção pelo ZIKV sobre a organização geral e o padrão de crescimento do telencéfalo.

Do mesmo modo, ao analisar os dados relativos ao comprimento do telencéfalo com mais cuidado, foi observada uma grande amplitude no grupo infectado, sugerindo um efeito dependente da carga viral. Ao testar essa hipótese, constatou-se que o comprimento do telencéfalo apresentou correlação negativa com a quantidade de ZIKV por indivíduo ($\rho = -0,602$; $p < 0,01$; Figura 7D). Estes resultados confirmam o impacto da infecção pelo ZIKV sobre o crescimento do telencéfalo.

Seguiu-se para as análises morfológicas de possíveis efeitos da infecção sobre o diencéfalo, vesícula encefálica também derivada do prosencéfalo. A largura do diencéfalo não diferiu estatisticamente entre os grupos ($p = 0,867$; Figura 8A). Entretanto, conforme apresentado na Figura 8B, essa medida apresentou correlação negativa com a carga viral dos embriões de cinco dias infectados pelo ZIKV ($\rho = -0,696$; $p < 0,001$).

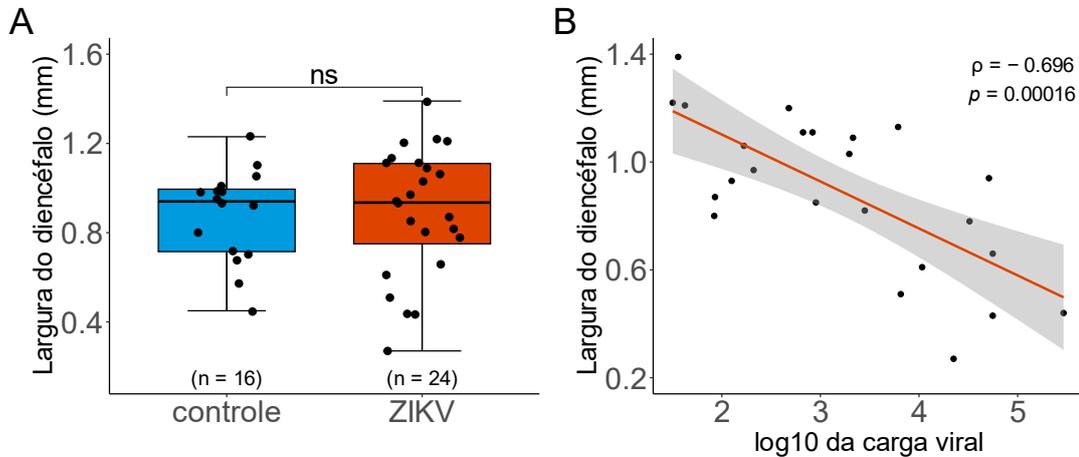
Figura 7 – Comparação do comprimento e da largura médios do telencéfalo, razão entre as medidas, correlação com a carga viral e imagens representativas de embriões de *G. gallus* com cinco dias de idade dos grupos controle e infectado



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: A-C – os gráficos apresentam a mediana de cada grupo; E – imagens representativas de embriões dos grupos controle e infectado pelo ZIKV ilustrando a relação entre a largura (linha verde) e o comprimento (linha vermelha) do telencéfalo, representados por triângulos em (C); * $p < 0,05$; ns $p \geq 0,05$; ponto usado como separador decimal; barra de escala: 1 mm

Figura 8 – Comparação da largura do diencéfalo e correlação com a carga viral de embriões de *G. gallus* com cinco dias de idade dos grupos controle e infectado



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: A – o gráfico apresenta a mediana de cada grupo; ns $p \geq 0,05$; ponto usado como separador decimal

A correlação entre as medidas e a quantidade de vírus por indivíduo sugere um efeito direto da infecção no tamanho das estruturas dependente da carga viral. Estas alterações em aspectos morfológicos poderiam ser explicadas pelos impactos sobre a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento dessas vesículas, afetando processos de proliferação e diferenciação celulares, por exemplo.

Levando em consideração os efeitos observados sobre genes que controlam o desenvolvimento inicial do telencéfalo e do diencéfalo de embriões infectados pelo ZIKV, bem como as estreitas interações entre estes genes e o desenvolvimento ocular, possíveis impactos do ZIKV sobre o desenvolvimento dos olhos foram analisados em seguida.

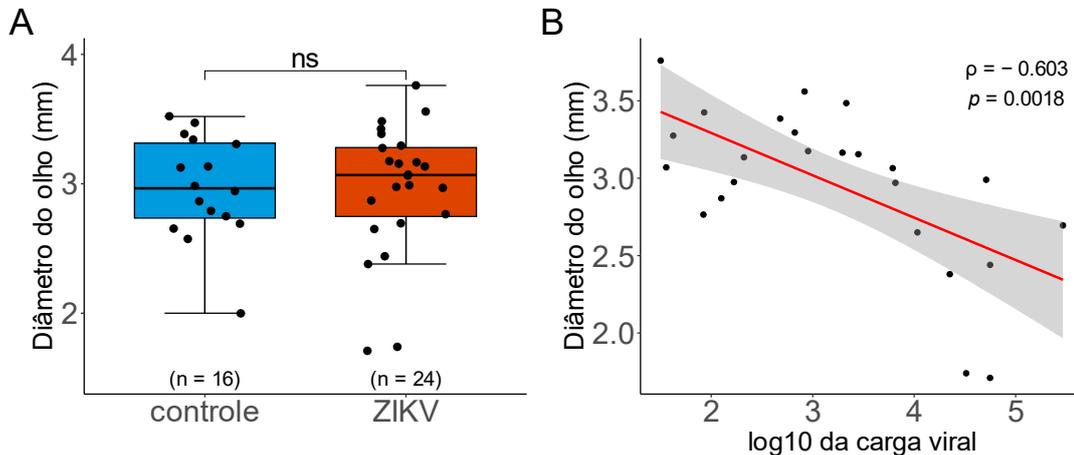
4.4 O DIÂMETRO MÉDIO DOS OLHOS ESTÁ CORRELACIONADO À QUANTIDADE DE ZIKV

Para avaliar os possíveis efeitos da infecção pelo ZIKV no desenvolvimento ocular, a média do diâmetro dos olhos de embriões com cinco dias de idade foi comparada entre os grupos controle e infectado pelo ZIKV.

Conforme mostrado na Figura 9A, não foram observadas alterações significativas no diâmetro médio dos olhos ($p = 0,772$). Entretanto, constatou-se uma correlação negativa entre a medida e a carga viral dos embriões infectados

($\rho = -0,603$; $p < 0,01$; Figura 9B). Isso indica um efeito sobre o diâmetro ocular dependente da carga de ZIKV.

Figura 9 – Comparação do diâmetro médio dos olhos e correlação com a carga viral de embriões de *G. gallus* com cinco dias de idade dos grupos controle e infectado



Fonte: elaborado pelo autor

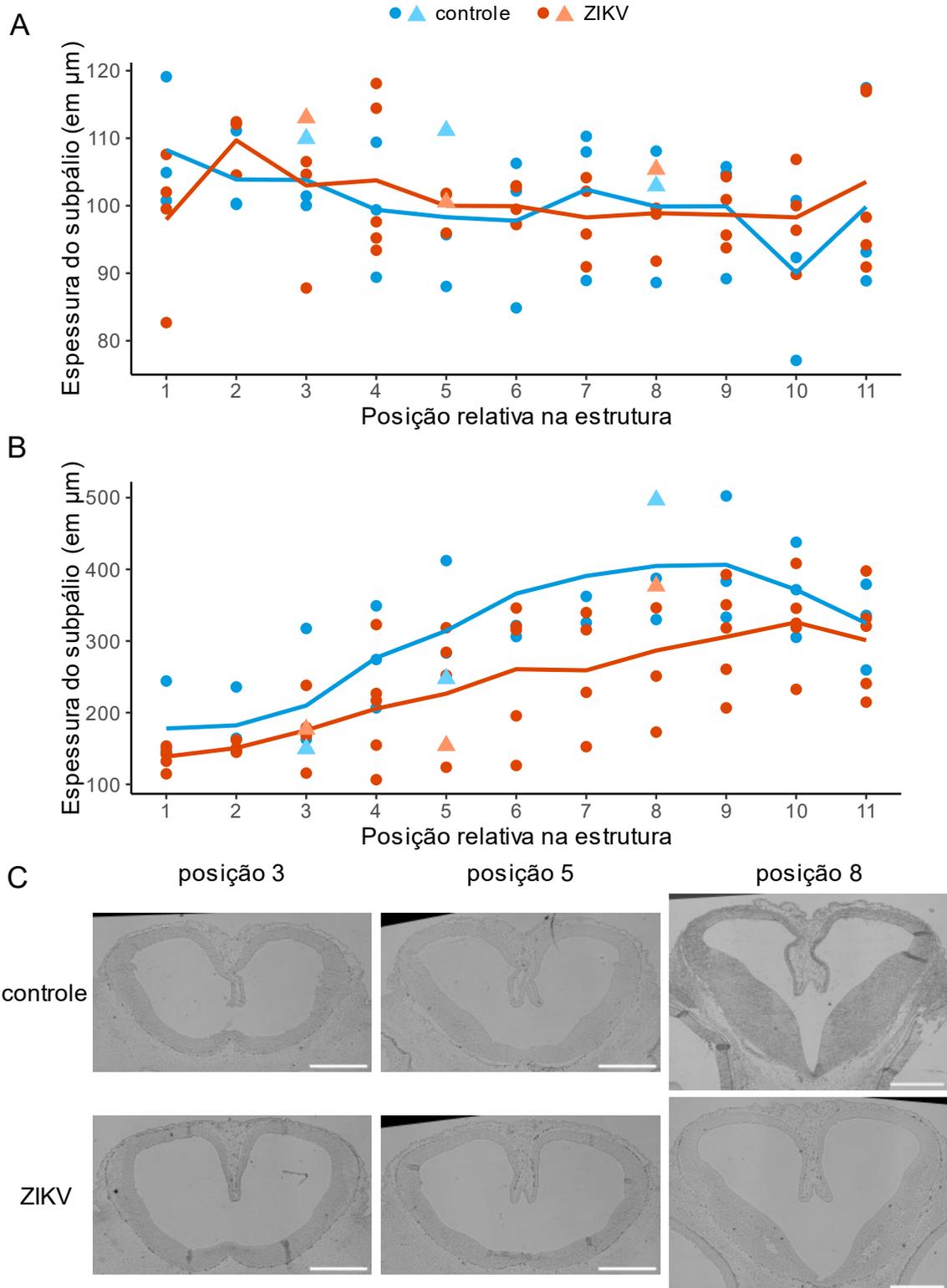
Legenda: A – o gráfico apresenta a mediana de cada grupo; ns $p \geq 0,05$; ponto usado como separador decimal

4.5 A ESPESSURA DA PAREDE DO TELENCEFALO VENTRAL É IMPACTADA PELO ZIKV

Os efeitos morfológicos da infecção pelo ZIKV sobre o telencéfalo ressaltaram a necessidade de investigar os impactos nessa estrutura de forma mais detalhada. Para isso, por meio de cortes histológicos, a espessura do neuroepitélio do pálio dorsal e do subpálio foi analisada. Estas regiões compreendem, respectivamente, as regiões dorsal e ventral do telencéfalo (Figura 4B). Os cortes histológicos foram realizados de forma sequencial, do telencéfalo ao diencéfalo, no plano coronal, abrangendo de modo amplo a morfologia do neuroepitélio do telencéfalo ao longo do eixo ântero-posterior.

Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas na distribuição das medidas da espessura do pálio dorsal entre os embriões controle e infectados pelo ZIKV ($D = 0,1989$, $p = 0,367$). Por outro lado, a distribuição do conjunto de medidas da espessura do subpálio diferiu estatisticamente entre os grupos ($D = 0,3236$, $p < 0,05$). A Figura 10 apresenta os gráficos de distribuição das medidas ao longo do eixo ântero-posterior e imagens representativas.

Figura 10 – Distribuição do conjunto de medidas da espessura média ao longo do eixo ântero-posterior do pálido dorsal e do subpálido e imagens representativas de embriões de *G. gallus* com cinco dias de idade dos grupos controle e infectado



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: a linha contínua representa a espessura média das medidas por grupo e posição; $n \geq 3$ cortes para cada posição nos grupos controle ($n = 3$ embriões) e infectado ($n = 5$ embriões); os embriões mostrados em (C) estão representados por triângulos em (A, B); barra de escala: $500 \mu\text{m}$

Estes resultados indicam que a infecção pelo ZIKV causa impactos no crescimento do subpálio, reforçando a hipótese de um efeito direto sobre a proliferação celular no neuroepitélio. Informações sobre os efeitos da infecção pelo ZIKV no desenvolvimento do subpálio são escassos, dado que a grande maioria dos trabalhos foca as investigações no desenvolvimento do pálio.

Para melhorar a compreensão sobre as vias moleculares afetadas pelo ZIKV que poderiam estar relacionadas aos impactos observados no subpálio, foi conduzida uma análise integrativa usando um banco de dados do próprio grupo de pesquisa com dados de expressão de 24 genes relacionados ao desenvolvimento craniofacial.

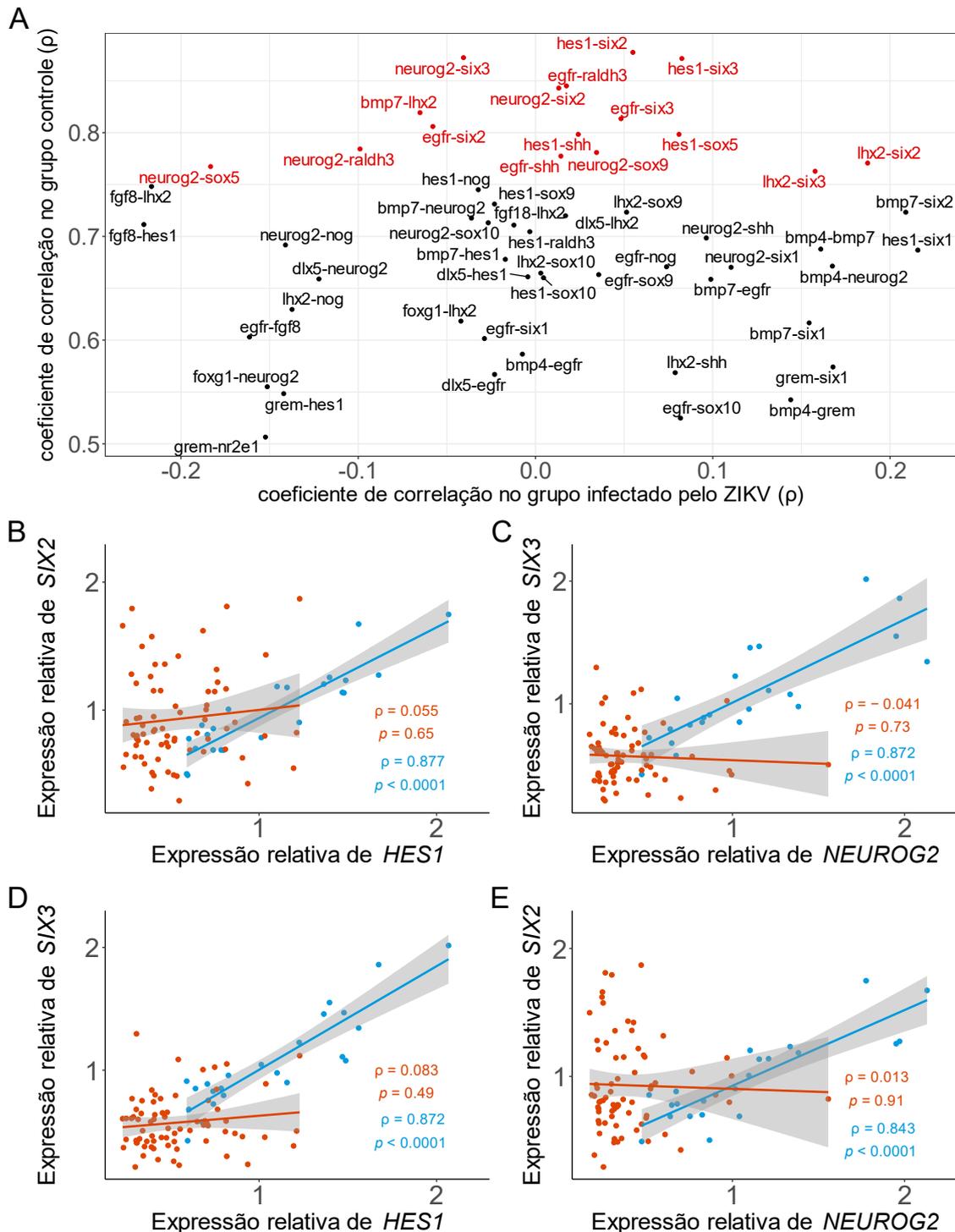
4.6 ANÁLISES COMPUTACIONAIS REVELAM POSSÍVEIS ALVOS MOLECULARES DO ZIKV

Considerando o efeito acentuado da infecção pelo ZIKV sobre genes relacionados à padronização e ao desenvolvimento do prosencéfalo em embriões de três dias, além dos impactos morfológicos em embriões de cinco dias, foi realizada uma análise de correlação de todos os dados de expressão gênica coletados pelo grupo de pesquisa.

Foram identificados genes com expressão altamente correlacionada entre si no grupo controle ($\rho > 0,5$ e $p < 0,05$) e que perderam essa correlação no grupo infectado pelo ZIKV ($p \geq 0,05$), indicando um desbalanço nas relações intergênicas. Conforme mostrado na Figura 11, muitos pares de genes tiveram as correlações alteradas pelo ZIKV. Duplas gênicas com alto coeficiente de correlação no grupo controle ($\rho > 0,75$) estão destacadas: *HES1-SIX2*, *NEUROG2-SIX3*, *HES1-SIX3*, *NEUROG2-SIX2*, *BMP7-LHX2*, *HES1-SHH*, *LHX2-SIX2* e *LHX2-SIX3*, por exemplo.

Para analisar os dados de forma integrada e tentar entender melhor que vias moleculares poderiam explicar os efeitos morfológicos observados, os genes com as correlações alteradas foram listados e usados em análises computacionais. A plataforma GeneMania foi usada para identificar relações intergênicas e, por meio do banco de dados STRING Database, foram analisadas possíveis interações proteína-proteína. A rede de interações entre os genes com a expressão avaliada e possíveis alvos gênicos relacionados são mostrados na Figura 12.

Figura 11 – Pares de genes com expressão altamente correlacionada no grupo controle ($\rho > 0,5$) e sem correlação no grupo infectado pelo ZIKV em embriões de *G. gallus* com três dias de idade e exemplos gráficos

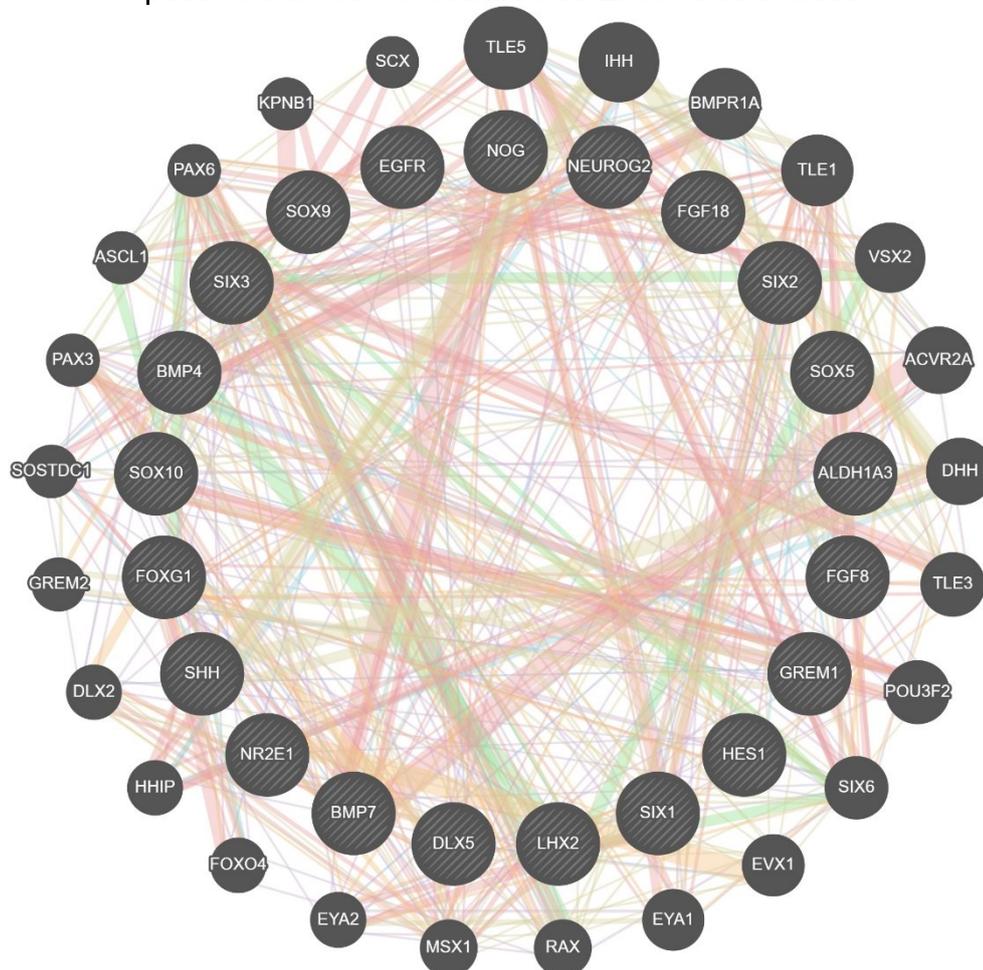


Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: A – em destaque as duplas gênicas com maior coeficiente de correlação no grupo controle ($\rho > 0,75$); os eixos do gráfico x e y representam, respectivamente, os coeficientes de correlação entre as expressões de genes dos grupos infectado e controle; B-E – exemplos gráficos das correlações entre os dados de expressão gênica; ponto usado como separador decimal

Da rede de interações entre genes, destacam-se os marcadores subpaliais *DLX2* e *ASCL1* (Puelles *et al.*, 2000; von Frowein; Campbell; Götz, 2002) e vários genes relacionados ao desenvolvimento ocular, como *VSX2*, *EYA1*, *EYA2*, *RAX* e *PAX6* (Diacou *et al.*, 2022). Também integraram a rede os membros da família de correpressores transcricionais TLE, *TLE1*, *TLE3* e *TLE5*. Homólogos vertebrados do gene *groucho* em *Drosophila*, estes fatores de transcrição atuam juntamente com as proteínas HES por meio da via de sinalização NOTCH, reprimindo a diferenciação neuronal (Gasperowicz; Otto, 2005).

Figura 12 – Rede de interações entre os genes com a expressão avaliada e possíveis alvos moleculares do ZIKV relacionados



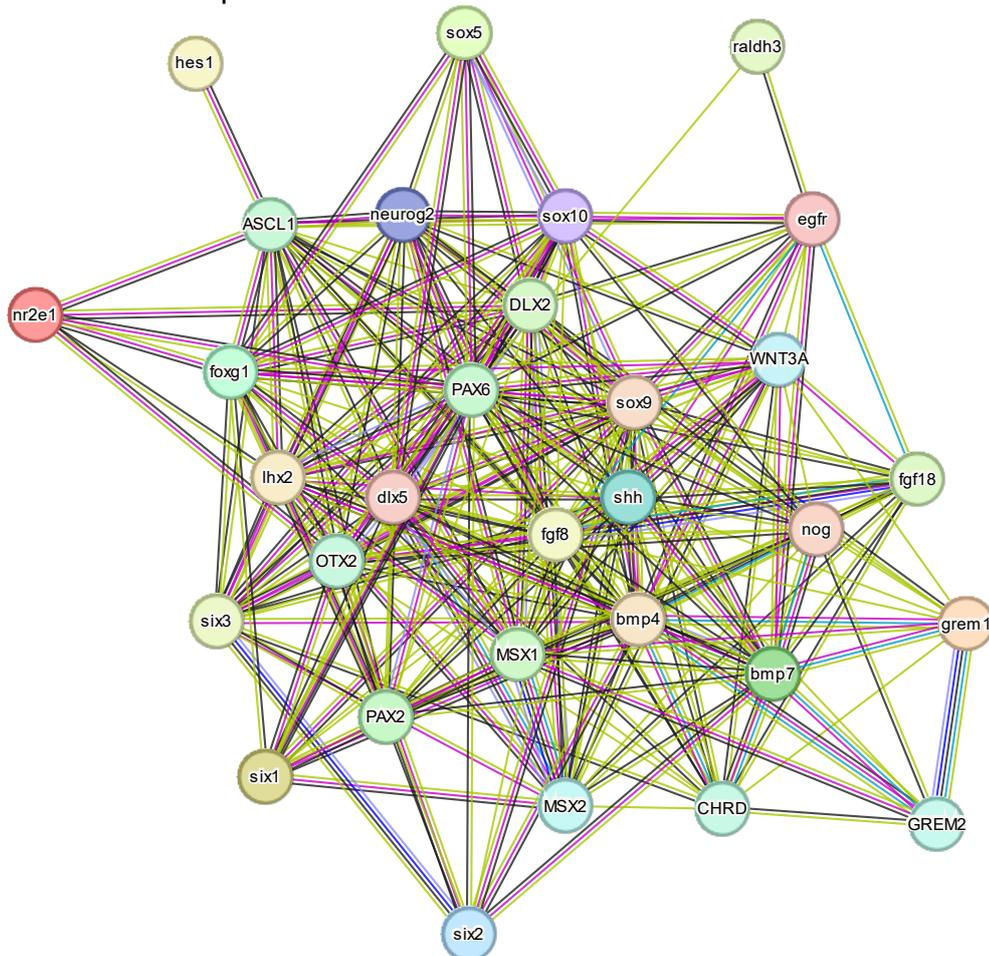
Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: genes buscados são mostrados em círculos listrados; novos genes são mostrados em círculos sem listras

Na análise realizada por meio da plataforma STRING Database, foram evidenciadas sobretudo proteínas relacionadas ao desenvolvimento do sistema nervoso central (Figura 13). São destacados os repressores transcricionais *MSX1* e

MSX2, diretamente envolvidos no desenvolvimento craniofacial, em especial na formação do crânio, das meninges e dos dentes (Alappat; Zhang; Chen, 2003). Também foram identificadas as proteínas OTX2, PAX6, WNT3A, GREM2, CHRD e, assim como na análise de interações intergênicas, DLX2 e ASCL1 – todas envolvidas no desenvolvimento craniofacial. OTX2 e PAX6 são expressos muito cedo no desenvolvimento do sistema nervoso central e estão envolvidos na padronização inicial do prosencéfalo (Beccari; Marco-Ferreres; Bovolenta, 2013). GREM2 e CHRD são proteínas secretadas que atuam como antagonistas da via de sinalização BMP (Chang, 2016). WNT3A é uma proteína que atua, principalmente, na formação do diencefalo, especialmente do tálamo (Louvi; Yoshida; Grove, 2007). OTX2, PAX2 e PAX6 também atuam no desenvolvimento ocular (Beby; Lamonerie, 2013; Paixão-Côrtes; Salzano; Bortolini, 2015).

Figura 13 – Rede de interação proteína-proteína entre os genes com a expressão avaliada e possíveis alvos moleculares do ZIKV relacionados



Fonte: elaborado pelo autor

Legenda: proteínas buscadas são mostradas em letras minúsculas; novas proteínas são mostradas em letras maiúsculas

Em conjunto, estes resultados indicam que a infecção pelo ZIKV é capaz de perturbar múltiplas vias moleculares, desde muito cedo no desenvolvimento embrionário. Os impactos sobre estas vias moleculares poderiam explicar a variedade de estruturas craniofaciais afetadas, como os impactos na morfologia do telencéfalo, do diencéfalo, dos olhos e do subpálio observados em embriões de cinco dias de idade infectados pelo ZIKV (Figuras 7, 8, 9 e 10, respectivamente).

5 DISCUSSÃO

Mesmo que os impactos da infecção pelo ZIKV sobre a expressão gênica do hospedeiro vertebrado sejam conhecidos (Christian; Song; Ming, 2019), os mecanismos pelos quais a regulação transcricional é modulada ainda não estão totalmente claros. Recentemente, Li *et al.* (2022) demonstraram que a proteína viral NS5 pode interagir diretamente com o DNA nuclear e inibir a transcrição gênica ao bloquear o processo de alongamento transcricional mediado pelo fator PAF1C, alterando o padrão de expressão nas células infectadas. Outras hipóteses para explicar estes impactos na expressão gênica consideram o sequestro da maquinaria celular do hospedeiro (Zeng *et al.*, 2020), modificações epigenéticas na cromatina elicidas pelo ZIKV (Janssens *et al.*, 2018; Kandilya *et al.*, 2019) e o papel de RNAs não codificantes (Bhagat *et al.*, 2018; Slonchak *et al.*, 2023). Em comparação a estudos *in vitro* e com diferentes cepas de ZIKV (Horibata *et al.*, 2021; Tiwari *et al.*, 2017), os efeitos observados sobre a expressão gênica de embriões infectados após 24 h da inoculação são surpreendentes levando em conta a quantidade de vírus inoculada e o método de exposição ao ZIKV, fora do corpo do embrião.

O gene com a expressão mais severamente afetada pela infecção pelo ZIKV foi *LHX2* (Figura 5C). Este efeito pode ser direto ou indireto, por meio de *SIX3*, *FOXG1* ou pela sinalização FGF, ativadores transcricionais de *LHX2* em outros vertebrados (Ando *et al.*, 2005; Godbole *et al.*, 2018; Seth *et al.*, 2006). A possibilidade de um efeito indireto é indicada pela diminuição da expressão gênica de *SIX3* (Figura 5A) e de *FGF8* (Souza, 2022; Taufer, 2023) em embriões de três dias de idade infectados pelo ZIKV. Conforme Chou e O'Leary (2013), o nocaute condicional de *LHX2* em camundongos, no E11.5, ocasiona a depleção de progenitores neurais e promove a neurogênese prematuramente, reduzindo o tamanho do telencéfalo e a espessura da camada cortical. Este desbalanço entre proliferação de progenitores e diferenciação neuronal também é observado em embriões murinos nocauteados para *NR2E1* (Roy; Thiels; Monaghan, 2002), gene também regulado negativamente pelo ZIKV (Figura 5D). O microRNA miR-9, regulador pós-transcricional de *NR2E1*, é regulado positivamente pelo ZIKV e está associado à microcefalia em camundongos (Zhang, H. *et al.*, 2019; Zhao *et al.*, 2009). A relação entre *LHX2* e *NR2E1* é complexa, mas ambos têm funções semelhantes e têm relação com o fenótipo microcefálico. O trabalho de Schmouth

et al. (2015) indicou que NR2E1 atua como repressor da transcrição de *LHX2* no telencéfalo de mamíferos, ao passo que Zuber *et al.* (2003) mostraram que NR2E1 ativa *LHX2* no desenvolvimento ocular em *Xenopus*. Destaca-se que este é o primeiro trabalho a demonstrar os impactos da infecção pelo ZIKV sobre a expressão de *SIX3*, *LHX2* e *NR2E1 in vivo*.

Uma das consequências moleculares da redução de *LHX2* possivelmente compreende a redução na expressão gênica de *HES1* e *CER1*. *HES1*, parcialmente controlado por *LHX2* (Chou; O'Leary, 2013), codifica um fator de transcrição efetor da via de sinalização NOTCH envolvido na manutenção das células progenitoras neurais num estado indiferenciado e proliferativo, também atuando no controle do balanço entre proliferação e diferenciação neuronal (Louvi; Artavanis-Tsakonas, 2006; Shimojo; Ohtsuka; Kageyama, 2011). Trabalhos anteriores já demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode desregular a via de sinalização NOTCH (Ferraris *et al.*, 2019), inibindo a expressão dos efetores *HES1*, *HES5* e *HEY2* (Bindu; Pandey; Seth, 2023). Segundo Hou *et al.* (2013), *LHX2* inibe a diferenciação não neural ao controlar a expressão de *CER1*, atenuando os efeitos das vias de sinalização BMP e WNT. Ademais, estes autores mostraram que a depleção de *CER1* pode reduzir a expressão de genes relacionados ao desenvolvimento cerebral, como *EMX1*, *EMX2*, *FOXP1* e *GSX2*.

Considerando o controle da diferenciação neuronal exercido por *LHX2* e *NR2E1*, e a redução na expressão de *HES1* (Figura 6A), esperava-se observar um aumento na expressão de *NEUROG2*. No entanto, a redução na expressão de *NEUROG2* (Figura 6C) sugere um efeito direto da infecção sobre a diferenciação neuronal. Trabalhos anteriores demonstraram que a infecção pelo ZIKV pode reduzir a diferenciação neuronal *in vitro* (Bayless *et al.*, 2016; McGrath *et al.*, 2017), *in vivo* (Garcez *et al.*, 2018) e diminuir a presença da proteína NEUN, marcadora de neurônios diferenciados, indicando um efeito neurodegenerativo (Santamaría; Rengifo; Torres-Fernández, 2023). Por outro lado, também há estudos mostrando que a infecção pelo ZIKV causa neurogênese prematura (Bindu; Pandey; Seth, 2023; Gabriel *et al.*, 2017; Saade *et al.*, 2020). Apesar de contraditórios, estes dados evidenciam que o ZIKV pode impactar diretamente a expressão de genes envolvidos na diferenciação neuronal.

O efeito dependente da quantidade de ZIKV sobre o diâmetro médio dos olhos observado em embriões de cinco dias (Figura 9B) pode ser relacionado às

funções de alguns dos genes com a expressão avaliada neste trabalho. Segundo Chou e Tole (2019), *LHX2* desempenha funções críticas durante o desenvolvimento ocular, considerando que embriões murinos nocauteados para *LHX2* não desenvolvem olhos (Porter *et al.*, 1997). De acordo com Tétreault, Champagne e Bernier (2009), embriões de camundongo sem *LHX2* apresentam redução na expressão de vários genes relacionados ao desenvolvimento dos olhos, como *DCT*, *MITF*, *VAX2* e *RAX*. Alterações no gene *PAX6*, identificado nas análises computacionais deste trabalho, são reconhecidas como causa de aniridia em humanos, condição caracterizada por hipoplasia ou ausência da íris (Hingorani; Hanson; van Heyningen, 2012; Paixão-Côrtes; Salzano; Bortolini, 2015). De modo semelhante, embriões de camundongo sem *NR2E1* apresentam problemas oculares associados à cegueira, como degeneração da retina e do nervo óptico (Yu *et al.*, 2000). Conforme relatado por Marques *et al.*, (2019), as principais manifestações oculares associadas à SCZ incluem lesões maculares, anormalidades do nervo óptico e alterações coriorretinianas. Os resultados apresentados neste trabalho são corroborados por Wachholz *et al.* (2021), que observaram redução na área ocular de embriões de galinha de cinco dias e meio de idade infectados com ZIKV. A infecção pelo ZIKV em camundongos recém-nascidos também causa defeitos no desenvolvimento ocular, como redução na espessura da retina (Li *et al.*, 2021).

O aumento da razão largura:comprimento do telencéfalo (Figura 7C) mostra um efeito sobre a organização geral dessa estrutura. Isso pode ser relacionado à repressão transcricional de genes que controlam a proliferação celular no telencéfalo, como *LHX2* e *NR2E1*, ambos com expressão reduzida pela exposição ao ZIKV (Figuras 5C e 5D, respectivamente). Cabe destacar que a morfogênese do telencéfalo também é influenciada por forças mecânicas, exercidas pelos tecidos adjacentes e pela pressão de fluido cerebrospinal embrionário (Garcia *et al.*, 2017, 2019). O fluido cerebrospinal, que preenche os ventrículos e o canal central da medula espinal, é produzido principalmente pelo plexo coroide, uma estrutura especializada altamente vascularizada que se desenvolve no interior do sistema ventricular (Lun; Monuki; Lehtinen, 2015). Kim *et al.* (2020) demonstraram que o ZIKV infecta pericitos do plexo coroide, sugerindo que a invasão do SNC pode ocorrer via fluido cerebrospinal. A hidrocefalia, manifestação clínica associada à SCZ (Aragao *et al.*, 2019; Marques *et al.*, 2019; van der Linden *et al.*, 2019), é uma condição clínica geralmente relacionada a perturbações na produção e reabsorção

do fluido cerebrospinal, o que ocasiona a dilatação dos ventrículos (Zhang; Williams; Rigamonti, 2006). Contudo, casos de hidrocefalia congênita geralmente estão associados a malformações morfológicas e podem ter causas genéticas, como mutações nos genes *OTX2* e *MSX1* (Kahle *et al.*, 2016; Zhang; Williams; Rigamonti, 2006). Curiosamente, estes genes foram identificados nas análises computacionais deste trabalho. Em conjunto, os resultados mostram que as análises de expressão gênica em embriões de três dias de idade podem ser relacionadas aos efeitos da infecção pelo ZIKV sobre a morfologia de embriões de cinco dias de idade.

Duy, Mehta e Kahle (2024) propõem que alterações morfológicas do telencéfalo, como ventriculomegalia, estariam relacionadas à força mecânica exercida pelo fluido cerebrospinal e a redução na espessura do neuroepitélio do telencéfalo causada pelo ZIKV. Isso poderia explicar o efeito sobre a espessura do subpálio ao longo do eixo ântero-posterior em embriões de cinco dias de idade infectados (Figura 10B). Alternativamente, essa hipótese contrasta com a correlação verificada entre a largura do diencéfalo e a carga viral dos embriões de cinco dias infectados (Figura 8B). Além de trabalhos demonstrando que o ZIKV infecta regiões do diencéfalo em embriões de galinha (Negi; Kuhn; Fekete, 2023; Thawani *et al.*, 2018), não há estudos avaliando os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre a morfogênese dessa vesícula encefálica. Contudo, já foi evidenciado que a infecção pelo ZIKV reduz a expressão de genes envolvidos no desenvolvimento do diencéfalo, como *SIX3* (Figura 5A), *SHH* e *BMP4* (Lagutin *et al.*, 2003; Martinez-Ferre; Martinez, 2012; Souza, 2022; Taufer, 2023; Thawani *et al.*, 2018). Conforme Noguchi *et al.* (2020), camundongos recém-nascidos infectados pelo ZIKV apresentaram degeneração no tálamo, estrutura derivada do diencéfalo, 13 dias após a inoculação do vírus.

Destaca-se que a redução da espessura cortical (telencéfalo dorsal) já foi descrita na literatura (Garcez *et al.*, 2018; Li *et al.*, 2016; Zhang, W. *et al.*, 2019). Contudo, estudos sobre os impactos da infecção pelo ZIKV sobre o desenvolvimento do subpálio em organismos-modelo não foram encontrados, podendo este ser o primeiro trabalho a demonstrar tal efeito. Conforme Gutin *et al.* (2006), o bloqueio de receptores de FGF impacta severamente a expressão de marcadores do subpálio, como *DLX2*. Os níveis de expressão de *GSX2* e de *DLX2* foram reduzidos significativamente em camundongos nocauteados para *SHH* (Rallu *et al.*, 2002). Estes estudos indicam que os impactos na espessura do neuroepitélio subpial

pode também ser um reflexo da depleção de *FGF8* e *SHH* pelo ZIKV (Souza, 2022; Tauffer, 2023). Em buscas na literatura, foram encontrados apenas alguns estudos demonstrando alterações funcionais de estruturas subpaliais causadas pela infecção pelo ZIKV em indivíduos juvenis ou adultos (Figueiredo *et al.*, 2019; Raper *et al.*, 2020). Salienta-se que o teste estatístico escolhido pode não ser o mais apropriado para a análise em questão. O teste de Kolmogorov-Smirnov compara estatisticamente funções de distribuição acumulada (distribuições de probabilidade), pelo critério da diferença máxima (Pratt; Gibbons, 1981). Devido a isso, a análise é realizada ordenando os valores do conjunto de dados de modo crescente, conforme o grupo, do menor ao maior, sem considerar a posição das medidas. Este teste foi escolhido numa tentativa de comparar a distribuição dos pontos de modo mais justo, já que testes de comparação de médias ou medianas também não seriam adequados. Esta questão ainda será analisada de forma mais aprofundada.

A partir de uma análise integrativa usando um banco de dados de expressão gênica do próprio grupo de pesquisa, foram identificados genes com expressão altamente correlacionada entre si no grupo controle e sem correlação no grupo infectado pelo ZIKV em embriões com três dias de idade (Figura 11). Essa perda de correlação observada no grupo infectado sugere que o ZIKV possa causar um desbalanço nas relações entre a expressão de genes que controlam o desenvolvimento craniofacial. Análises computacionais usando as plataformas GeneMANIA e STRING Database foram realizadas para investigar de forma integrativa as vias moleculares potencialmente afetadas pelo ZIKV. As redes de interação evidenciaram genes e proteínas que podem ser diretamente relacionados aos fenótipos observados em embriões infectados, como marcadores subpaliais e vários controladores do desenvolvimento craniofacial (Figuras 12 e 13).

Este estudo investigou os efeitos da infecção pelo ZIKV no desenvolvimento inicial de estruturas derivadas do prosencéfalo em embriões de *G. gallus*. Foi constatada redução na expressão de genes importantes para o controle do desenvolvimento cerebral, como *SIX3*, *LHX2*, *NR2E1*, *HES1*, *CER1* e *NEUROG2*. Aspectos morfológicos do telencéfalo, do diencéfalo e dos olhos também foram impactados e correlacionados à carga viral nas amostras. Análises computacionais identificaram possíveis alvos moleculares do ZIKV, como genes ou proteínas relacionados ao desenvolvimento craniofacial, fornecendo novos elementos sobre a fisiopatologia do ZIKV no sistema nervoso central ainda pouco explorados.

6 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Neste trabalho foram avaliados os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre o controle molecular e aspectos morfológicos do desenvolvimento do prosencéfalo e de estruturas derivadas usando embriões de *G. gallus*.

A exposição ao ZIKV por 24 h em embriões de três dias de idade diminuiu a expressão de *SIX3*, *NR2E1* e *LHX2*, genes que codificam importantes fatores de transcrição para o controle do desenvolvimento do prosencéfalo. Ademais, genes-alvo de *LHX2*, como *HES1* e *CER1*, também tiveram a expressão regulada negativamente pelo ZIKV. Ao contrário do que era inicialmente esperado, a infecção também reduziu a expressão de *NEUROG2*, fator de transcrição que atua sobre a diferenciação neuronal no sistema nervoso central. Em conjunto, estes resultados demonstram os impactos da infecção pelo ZIKV sobre vias moleculares que controlam a padronização e o desenvolvimento do prosencéfalo, sugerindo efeitos sobre a proliferação e a diferenciação das células progenitoras neurais no sistema nervoso central.

Também foram identificados impactos sobre o crescimento do telencéfalo, conforme a razão entre a largura e o comprimento da estrutura, e aspectos morfológicos do telencéfalo, do diencéfalo e dos olhos foram correlacionados à quantidade de ZIKV individual. Observou-se também que a infecção pelo ZIKV impactou o crescimento do neuroepitélio subpalial ao longo do eixo ântero-posterior. São necessárias análises mais detalhadas para avaliar os efeitos da infecção pelo ZIKV sobre o controle molecular da padronização e do desenvolvimento do subpálio, uma estrutura ainda pouco estudada e que pode ser afetada pela infecção. Além disso, as consequências da infecção pelo ZIKV sobre estruturas encefálicas pouco visíveis externamente, como as derivadas do diencéfalo, demandam investigações adicionais e mais aprofundadas.

Em relação ao desenvolvimento ocular, foi possível observar um efeito dependente da quantidade de ZIKV sobre o diâmetro médio dos olhos de embriões de cinco dias. Sugere-se que estas alterações morfológicas possam ser relacionadas aos efeitos do ZIKV na expressão gênica em embriões de três dias de idade. Estudos avaliando as implicações da infecção pelo ZIKV no controle molecular do desenvolvimento inicial do sistema visual são necessários,

especialmente com relação à expressão de genes identificados nas análises computacionais, como *RAX* e genes das famílias *PAX*, *EYA* e *VSX*.

Análises de correlação entre a expressão de genes que controlam o desenvolvimento craniofacial sugeriram que a infecção pelo ZIKV pode causar um desbalanço nestas relações intergênicas. No entanto, este cenário é complexo e difícil de ser avaliado examinando os dados isoladamente. Futuramente, análises computacionais integradas, com o intuito de construir um modelo de aprendizado de máquina (*machine learning*), poderiam destacar genes ou grupos de genes de maior relevância para explicar as manifestações clínicas associadas à SCZ.

Conjuntamente, estes resultados mostraram que o ZIKV pode afetar o desenvolvimento embrionário desde muito cedo, sendo capaz de impactar várias vias de sinalização molecular relacionadas ao desenvolvimento inicial de estruturas derivadas do prosencéfalo, incluindo o telencéfalo, o diencéfalo e os olhos.

REFERÊNCIAS

ALAPPAT, S.; ZHANG, Z. Y.; CHEN, Y. P. *Msx* homeobox gene family and craniofacial development. **Cell Research**, [s. l.], v. 13, n. 6, p. 429–442, 2003.

ANDO, H. *et al.* *Lhx2* mediates the activity of *Six3* in zebrafish forebrain growth. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 287, n. 2, p. 456–468, 2005.

ARAGAO, M. de F. V. V. *et al.* Updated imaging findings in congenital Zika syndrome. **Topics in Magnetic Resonance Imaging**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 1–14, 2019.

BACHE, S.; WICKHAM, H. **magrittr: a forward-pipe operator for R**. Versão 2.0.3. [S. l.: s. n.], 2022. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=magrittr>.

BASARAB, M. *et al.* Zika virus. **The BMJ**, London, v. 352, p. [1–7], 2016.

BASILE, K.; KOK, J.; DWYER, D. E. Zika virus: what, where from and where to? **Pathology**, [s. l.], v. 49, n. 7, p. 698–706, 2017.

BAUD, D. *et al.* An update on Zika virus infection. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 2017.

BAYLESS, N. L. *et al.* Zika virus infection induces cranial neural crest cells to produce cytokines at levels detrimental for neurogenesis. **Cell Host & Microbe**, [s. l.], v. 20, n. 4, p. 423–428, 2016.

BEBY, F.; LAMONERIE, T. The homeobox gene *Otx2* in development and disease. **Experimental Eye Research**, [s. l.], v. 111, p. 9–16, 2013.

BECCARI, L.; MARCO-FERRERES, R.; BOVOLENTA, P. The logic of gene regulatory networks in early vertebrate forebrain patterning. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 130, n. 2–3, p. 95–111, 2013.

BHAGAT, R. *et al.* Zika virus E protein alters the properties of human fetal neural stem cells by modulating microRNA circuitry. **Cell Death & Differentiation**, [s. l.], v. 25, n. 10, p. 1837–1854, 2018.

BIANCHI, L. M. **Developmental Neurobiology**. New York: Garland Science, 2018.

BINDU; PANDEY, H. S.; SETH, P. Interplay between Zika virus-induced autophagy and neural stem cell fate determination. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], 2023.

BRUFORD, E. A. *et al.* Guidelines for human gene nomenclature. **Nature Genetics**, [s. l.], v. 52, n. 8, p. 754–758, 2020.

BURT, D. W. *et al.* The chicken gene nomenclature committee report. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 10, n. suppl. 2, p. [1–5], 2009.

CAMACHO, C. *et al.* BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. [1–9], 2009.

- CAUCHEMEZ, S. *et al.* Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.
- CHAN, C. *et al.* **rio: a Swiss-army knife for data file I/O**. Versão 1.0.1. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=rio>.
- CHANG, C. Agonists and antagonists of TGF- β family ligands. **Cold Spring Harbor Perspectives in Biology**, [s. l.], v. 8, n. 8, p. [1–51], 2016.
- CHOU, S.-J. *et al.* Lhx2 specifies regional fate in Emx1 lineage of telencephalic progenitors generating cerebral cortex. **Nature Neuroscience**, [s. l.], v. 12, n. 11, p. 1381–1389, 2009.
- CHOU, S.-J.; O’LEARY, D. D. M. Role for Lhx2 in corticogenesis through regulation of progenitor differentiation. **Molecular and Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 56, p. 1–9, 2013.
- CHOU, S.-J.; TOLE, S. Lhx2, an evolutionarily conserved, multifunctional regulator of forebrain development. **Brain Research**, [s. l.], v. 1705, p. 1–14, 2019.
- CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. Pathophysiology and mechanisms of Zika virus infection in the nervous system. **Annual Review of Neuroscience**, [s. l.], v. 42, n. 1, p. 249–269, 2019.
- CLARK, K. *et al.* GenBank. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 44, n. D1, p. D67–D72, 2016.
- CORRENS, A. *et al.* BMP antagonists in tissue development and disease. **Matrix Biology Plus**, [s. l.], v. 11, p. [1–15], 2021.
- DAWKINS, R. **O gene egoísta**. São Paulo: Companhia das Letras, 2007.
- DHANESH, S. B.; SUBASHINI, C.; JAMES, J. Hes1: the maestro in neurogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, [s. l.], v. 73, n. 21, p. 4019–4042, 2016.
- DIACOU, R. *et al.* Cell fate decisions, transcription factors and signaling during early retinal development. **Progress in Retinal and Eye Research**, [s. l.], v. 91, p. [1–31], 2022.
- DICK, G. W. A. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.
- DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika Virus (I). Isolations and serological specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.
- DUY, P. Q.; MEHTA, N. H.; KAHLE, K. T. The “microcephalic hydrocephalus” paradox as a paradigm of altered neural stem cell biology. **Cerebral Cortex**, [s. l.], v. 34, n. 1, p. 1–11, 2024.

- DYER, O. Zika virus spreads across Americas as concerns mount over birth defects. **The BMJ**, London, v. 351, p. [1–2], 2015.
- FAIÇAL, A. V. *et al.* Neurodevelopmental delay in normocephalic children with in utero exposure to Zika virus. **BMJ Paediatrics Open**, [s. l.], v. 3, n. 1, p. [1–3], 2019.
- FERRARIS, P. *et al.* Zika virus differentially infects human neural progenitor cells according to their state of differentiation and dysregulates neurogenesis through the Notch pathway. **Emerging Microbes and Infections**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 1003–1016, 2019.
- FIGUEIREDO, C. P. *et al.* Zika virus replicates in adult human brain tissue and impairs synapses and memory in mice. **Nature Communications**, [s. l.], v. 10, n. 1, p. [1–16], 2019.
- FRANZ, M. *et al.* GeneMANIA update 2018. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n. W1, p. W60–W64, 2018.
- FREITAS, D. A. *et al.* Congenital Zika syndrome: a systematic review. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 12, p. [1–27], 2020.
- GABRIEL, E. *et al.* Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 20, n. 3, p. 397–406, 2017.
- GALLO, L. G. *et al.* Another piece of the Zika puzzle: assessing the associated factors to microcephaly in a systematic review and meta-analysis. **BMC Public Health**, [s. l.], v. 20, n. 1, p. [1–15], 2020.
- GARCEZ, P. P. *et al.* Zika virus impairs the development of blood vessels in a mouse model of congenital infection. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 12774, 2018.
- GARCIA, K. E. *et al.* Contraction and stress-dependent growth shape the forebrain of the early chicken embryo. **Journal of the Mechanical Behavior of Biomedical Materials**, [s. l.], v. 65, p. 383–397, 2017.
- GARCIA, K. E. *et al.* Molecular and mechanical signals determine morphogenesis of the cerebral hemispheres in the chicken embryo. **Development**, [s. l.], v. 146, n. 20, p. [1–12], 2019.
- GASPEROWICZ, M.; OTTO, F. Mammalian Groucho homologs: redundancy or specificity? **Journal of Cellular Biochemistry**, [s. l.], v. 95, n. 4, p. 670–687, 2005.
- GENG, X. *et al.* Six3 dosage mediates the pathogenesis of holoprosencephaly. **Development**, [s. l.], v. 143, n. 23, p. 4462–4473, 2016.
- GEORGALA, P. A.; CARR, C. B.; PRICE, D. J. The role of Pax6 in forebrain development. **Developmental Neurobiology**, [s. l.], v. 71, n. 8, p. 690–709, 2011.
- GESTRI, G. *et al.* Six3 functions in anterior neural plate specification by promoting cell proliferation and inhibiting *Bmp4* expression. **Development**, [s. l.], v. 132, n. 10, p. 2401–2413, 2005.

GODBOLE, G. *et al.* Hierarchical genetic interactions between FOXG1 and LHX2 regulate the formation of the cortical hem in the developing telencephalon.

Development, [s. l.], v. 145, n. 1, p. [1–8], 2018.

GREGORY, C. J. *et al.* Modes of transmission of Zika virus. **The Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 216, n. suppl. 10, p. S875–S883, 2017.

GUTIN, G. *et al.* FGF signalling generates ventral telencephalic cells independently of SHH. **Development**, [s. l.], v. 133, n. 15, p. 2937–2946, 2006.

HABY, M. M. *et al.* Prevalence of asymptomatic Zika virus infection: a systematic review. **Bulletin of the World Health Organization**, [s. l.], v. 96, n. 6, p. 402–413D, 2018.

HENRY, R. Etymologia: Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 20, n. 6, p. 1090, 2014.

HERVE, M. **RVAideMemoire: testing and plotting procedures for Biostatistics**. [S. l.: s. n.], 2023. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=RVAideMemoire>.

HEYMANN, D. L. *et al.* Zika virus and microcephaly: why is this situation a PHEIC? **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10020, p. 719–721, 2016.

HINGORANI, M.; HANSON, I.; VAN HEYNINGEN, V. Aniridia. **European Journal of Human Genetics**, [s. l.], v. 20, n. 10, p. 1011–1017, 2012.

HORIBATA, S. *et al.* Host gene expression modulated by Zika virus infection of human-293 cells. **Virology**, [s. l.], v. 552, p. 32–42, 2021.

HOU, P.-S. *et al.* LHX2 regulates the neural differentiation of human embryonic stem cells via transcriptional modulation of PAX6 and CER1. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 41, n. 16, p. 7753–7770, 2013.

HOU, W. *et al.* Molecular cloning and characterization of the genes encoding the proteins of Zika virus. **Gene**, [s. l.], v. 628, p. 117–128, 2017.

HOU, P.-S. *et al.* Transcription and beyond: delineating FOXG1 function in cortical development and disorders. **Frontiers in Cellular Neuroscience**, [s. l.], v. 14, p. [1–14], 2020.

HSU, L. C.-L. *et al.* Lhx2 regulates the timing of β -catenin-dependent cortical neurogenesis. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 112, n. 39, p. 12199–12204, 2015.

IMAYOSHI, I.; KAGEYAMA, R. bHLH factors in self-renewal, multipotency, and fate choice of neural progenitor cells. **Neuron**, [s. l.], v. 82, n. 1, p. 9–23, 2014.

ISLAM, M. M.; ZHANG, C.-L. TLX: A master regulator for neural stem cell maintenance and neurogenesis. **Biochimica et Biophysica Acta**, [s. l.], v. 1849, n. 2, p. 210–216, 2015.

JANSSENS, S. *et al.* Zika virus alters DNA methylation of neural genes in an

organoid model of the developing human brain. **mSystems**, [s. l.], v. 3, n. 1, 2018.

KAGEYAMA, R.; SHIMOJO, H.; IMAYOSHI, I. Dynamic expression and roles of Hes factors in neural development. **Cell and Tissue Research**, [s. l.], v. 359, n. 1, p. 125–133, 2015.

KAHLE, K. T. *et al.* Hydrocephalus in children. **The Lancet**, [s. l.], v. 387, n. 10020, p. 788–799, 2016.

KANDILYA, D. *et al.* Zika virus alters DNA methylation status of genes involved in Hippo signaling pathway in human neural progenitor cells. **Epigenomics**, [s. l.], v. 11, n. 10, p. 1143–1161, 2019.

KARCH, J. D. Outliers may not be automatically removed. **Journal of Experimental Psychology: General**, [s. l.], v. 152, n. 6, p. 1735–1753, 2023.

KASSAMBARA, A. **ggpubr: “ggplot2” based publication ready plots**. Versão 1.0.1. [S. l.: s. n.], 2023a. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=ggpubr>.

KASSAMBARA, A. **rstatix: pipe-friendly framework for basic statistical tests**. Versão 0.7.2. [S. l.: s. n.], 2023b. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=rstatix>.

KIM, J. *et al.* Zika virus infects pericytes in the choroid plexus and enters the central nervous system through the blood-cerebrospinal fluid barrier. **PLOS Pathogens**, [s. l.], v. 16, n. 5, p. e1008204, 2020.

KOBAYASHI, D. *et al.* Early subdivisions in the neural plate define distinct competence for inductive signals. **Development**, [s. l.], v. 129, n. 1, p. 83–93, 2002.

KOMARASAMY, T. V. *et al.* Zika virus neuropathogenesis: the different brain cells, host factors and mechanisms involved. **Frontiers in Immunology**, [s. l.], v. 13, p. [1–16], 2022.

KUMAMOTO, T.; HANASHIMA, C. Evolutionary conservation and conversion of Foxg1 function in brain development. **Development, Growth & Differentiation**, [s. l.], v. 59, n. 4, p. 258–269, 2017.

LAGUTIN, O. V. *et al.* Six3 repression of Wnt signaling in the anterior neuroectoderm is essential for vertebrate forebrain development. **Genes & Development**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 368–379, 2003.

LANCIOTTI, R. S. *et al.* Genetic and serologic properties of Zika Virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 14, n. 8, p. 1232–1239, 2008.

LEÃO, V. H. P. *et al.* Congenital Zika virus infection: a review with emphasis on the spectrum of brain abnormalities. **Current Neurology and Neuroscience Reports**, [s. l.], v. 20, n. 11, p. [1–11], 2020.

LEFKOWITZ, E. J. *et al.* Virus taxonomy: the database of the International Committee on Taxonomy of Viruses (ICTV). **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 46, n.

D1, p. D708–D717, 2018.

LI, P. *et al.* The RNA polymerase of cytoplasmically replicating Zika virus binds with chromatin DNA in nuclei and regulates host gene transcription. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 119, n. 49, p. [1–12], 2022.

LI, C. *et al.* Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 19, n. 1, p. 120–126, 2016.

LI, Y. *et al.* Zika virus induces neuronal and vascular degeneration in developing mouse retina. **Acta Neuropathologica Communications**, [s. l.], v. 9, p. [1–15], 2021.

LIU, B. *et al.* *Foxg1* deletion impairs the development of the epithalamus. **Molecular Brain**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. [1–11], 2018.

LIU, W. *et al.* Six3 activation of *Pax6* expression is essential for mammalian lens induction and specification. **The EMBO Journal**, [s. l.], v. 25, n. 22, p. 5383–5395, 2006.

LIU, Z.-Y.; SHI, W.-F.; QIN, C.-F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nature Reviews Microbiology**, [s. l.], v. 17, n. 3, p. 131–139, 2019.

LOUVI, A.; ARTAVANIS-TSAKONAS, S. Notch signalling in vertebrate neural development. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 7, n. 2, p. 93–102, 2006.

LOUVI, A.; YOSHIDA, M.; GROVE, E. A. The derivatives of the *Wnt3a* lineage in the central nervous system. **Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 504, n. 5, p. 550–569, 2007.

LUN, M. P.; MONUKI, E. S.; LEHTINEN, M. K. Development and functions of the choroid plexus–cerebrospinal fluid system. **Nature Reviews Neuroscience**, [s. l.], v. 16, n. 8, p. 445–457, 2015.

MACNAMARA, F. N. Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.

MANGALE, V. S. *et al.* Lhx2 selector activity specifies cortical identity and suppresses hippocampal organizer fate. **Science**, [s. l.], v. 319, n. 5861, p. 304–309, 2008.

MARINHO, F. *et al.* Microcefalia no Brasil: prevalência e caracterização dos casos a partir do Sistema de Informações sobre Nascidos Vivos (Sinasc), 2000-2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, Brasília, v. 25, n. 4, p. 701–712, 2016.

MARQUES, V. de M. *et al.* Neurological complications of congenital Zika virus infection. **Pediatric Neurology**, [s. l.], v. 91, p. 3–10, 2019.

MARTINEZ-FERRE, A.; MARTINEZ, S. Molecular regionalization of the diencephalon. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 6, p. [1–10], 2012.

MARTINEZ, E. *et al.* Visual findings in children exposed to Zika *in utero* in Nicaragua. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, [s. l.], v. 17, n. 5, p. [1–14], 2023.

MCCLOSKEY, B.; ENDERICKS, T. The rise of Zika infection and microcephaly: what can we learn from a public health emergency? **Public Health**, [s. l.], v. 150, p. 87–92, 2017.

MCGRATH, E. L. *et al.* Differential responses of human fetal brain neural stem cells to Zika virus infection. **Stem Cell Reports**, [s. l.], v. 8, n. 3, p. 715–727, 2017.

MEDINA, L. Evolution and embryological development of forebrain. *In*: BINDER, M. D.; HIROKAWA, N.; WINDHORST, U. (eds.). **Encyclopedia of Neuroscience**. Berlin: Springer, 2009. p. 1172–1192.

MELO, A. S. de O. *et al.* Congenital Zika virus infection: beyond neonatal microcephaly. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 73, n. 12, p. 1407, 2016.

MENDES, A. K. T. *et al.* Congenital Zika syndrome: association between the gestational trimester of maternal infection, severity of brain computed tomography findings and microcephaly at birth. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 62, p. [1–8], 2020.

MERFELD, E. *et al.* Potential mechanisms of Zika-linked microcephaly. **WIREs Developmental Biology**, [s. l.], v. 6, n. 4, p. [1–14], 2017.

MULKEY, S. B. *et al.* Neurodevelopmental abnormalities in children with in utero Zika virus exposure without congenital Zika syndrome. **JAMA Pediatrics**, [s. l.], v. 174, n. 3, p. 269–276, 2020.

NASCIMENTO, C. S. *et al.* Identification of suitable reference genes for real time quantitative polymerase chain reaction assays on *Pectoralis major* muscle in chicken (*Gallus gallus*). **PLoS ONE**, [s. l.], v. 10, n. 5, p. [1–15], 2015.

NEGI, V.; KUHN, R. J.; FEKETE, D. M. Exploring the expression and function of cTyro3, a candidate Zika virus receptor, in the embryonic chicken brain and inner ear. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 1, p. [1–21], 2023.

NOGUCHI, K. K. *et al.* Zika virus infection in the developing mouse produces dramatically different neuropathology dependent on viral strain. **The Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 40, n. 5, p. 1145–1161, 2020.

OLIVEIRA, W. K. de *et al.* Infection-related microcephaly after the 2015 and 2016 Zika virus outbreaks in Brazil: a surveillance-based analysis. **The Lancet**, [s. l.], v. 390, n. 10097, p. 861–870, 2017.

OLIVOTO, T.; LÚCIO, A. D. metan: An R package for multi-environment trial analysis. **Methods in Ecology and Evolution**, [s. l.], v. 11, n. 6, p. 783–789, 2020.

PAIXÃO-CÔRTEZ, V. R.; SALZANO, F. M.; BORTOLINI, M. C. Origins and evolvability of the PAX family. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, [s. l.], v. 44, p. 64–74, 2015.

PAIXÃO, E. S. *et al.* Mortality from congenital Zika syndrome — nationwide cohort study in Brazil. **New England Journal of Medicine**, [s. l.], v. 386, n. 8, p. 757–767, 2022.

PEDERSEN, T. **patchwork: the composer of plots**. Versão 1.2.0. [S. l.: s. n.], 2024. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=patchwork>.

PEITER, P. C. *et al.* Zika epidemic and microcephaly in Brazil: challenges for access to health care and promotion in three epidemic areas. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 7, p. [1–15], 2020.

PFAFFL, M. W. A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 29, n. 9, p. 2002–2007, 2001.

PICCOLO, S. *et al.* The head inducer Cerberus is a multifunctional antagonist of Nodal, BMP and Wnt signals. **Nature**, [s. l.], v. 397, n. 6721, p. 707–710, 1999.

PIELNAA, P. *et al.* Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, [s. l.], v. 543, p. 34–42, 2020.

PLOURDE, A. R.; BLOCH, E. M. A literature review of Zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n. 7, p. 1185–1192, 2016.

POMBERO, A.; MARTINEZ, S. Telencephalic morphogenesis during the process of neurulation: an experimental study using quail-chick chimeras. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 512, n. 6, p. 784–797, 2009.

PORTER, F. D. *et al.* *Lhx2*, a LIM homeobox gene, is required for eye, forebrain, and definitive erythrocyte development. **Development**, [s. l.], v. 124, n. 15, p. 2935–2944, 1997.

POSIT TEAM. **RStudio: integrated development environment for R**. Versão 2023.12.1.402. Boston: Posit Software, PBC, 2024. Disponível em: <http://www.posit.co/>.

POSTLER, T. S. *et al.* Renaming of the genus *Flavivirus* to *Orthoflavivirus* and extension of binomial species names within the family *Flaviviridae*. **Archives of Virology**, [s. l.], v. 168, n. 9, p. 224, 2023.

PRATT, J. W.; GIBBONS, J. D. **Concepts of Nonparametric Theory**. New York: Springer-Verlag, 1981. (Springer Series in Statistics).

PREIBISCH, S.; SAALFELD, S.; TOMANCAK, P. Globally optimal stitching of tiled 3D microscopic image acquisitions. **Bioinformatics**, [s. l.], v. 25, n. 11, p. 1463–1465, 2009.

PUELLES, L. *et al.* A developmental ontology for the mammalian brain based on the prosomeric model. **Trends in Neurosciences**, [s. l.], v. 36, n. 10, p. 570–578, 2013.

PUELLES, L. Developmental studies of avian brain organization. **The International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 62, n. 1–2–3, p. 207–224, 2018.

PUELLES, L. *et al.* Pallial and subpallial derivatives in the embryonic chick and mouse telencephalon, traced by the expression of the genes *Dlx-2*, *Emx-1*, *Nkx-2.1*, *Pax-6*, and *Tbr-1*. **The Journal of Comparative Neurology**, [s. l.], v. 424, n. 3, p. 409–438, 2000.

PUELLES, L.; MARTINEZ, S. Patterning of the Diencephalon. *In*: RUBENSTEIN, J. L. R.; RAKIC, P. (eds.). **Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS: Comprehensive Developmental Neuroscience**. London: Academic Press, 2013. p. 151–172.

R CORE TEAM. **R: a language and environment for statistical computing**. Versão 4.3.3. Vienna: R Foundation for Statistical Computing, 2024. Disponível em: <https://www.r-project.org/>.

RAJENDRAM, R.; PREEDY, V. R.; PATEL, V. B. Research and recommended resources on Zika virus, pathology, and control. *In*: MARTIN, C. R. *et al.* (eds.). **Zika virus biology, transmission, and pathways: the neuroscience of Zika virus**. London: Academic Press, 2021. v. 1. p. 479–491.

RALLU, M. *et al.* Dorsoventral patterning is established in the telencephalon of mutants lacking both *Gli3* and Hedgehog signaling. **Development**, [s. l.], v. 129, n. 21, p. 4963–4974, 2002.

RAPER, J. *et al.* Long-term alterations in brain and behavior after postnatal Zika virus infection in infant macaques. **Nature Communications**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 2534, 2020.

ROBERTS, D. B. *Drosophila melanogaster*: the model organism. **Entomologia Experimentalis et Applicata**, [s. l.], v. 121, n. 2, p. 93–103, 2006.

ROY, K. *et al.* The *Tlx* gene regulates the timing of neurogenesis in the cortex. **Journal of Neuroscience**, [s. l.], v. 24, n. 38, p. 8333–8345, 2004.

ROY, K.; THIELS, E.; MONAGHAN, A. P. Loss of the *tailless* gene affects forebrain development and emotional behavior. **Physiology & Behavior**, [s. l.], v. 77, n. 4–5, p. 595–600, 2002.

SAADE, M. *et al.* Multimerization of Zika virus-NS5 causes ciliopathy and forces premature neurogenesis. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 27, n. 6, p. 920–936, 2020.

SANTAMARÍA, G.; RENGIFO, A. C.; TORRES-FERNÁNDEZ, O. NeuN distribution in brain structures of normal and Zika-infected suckling mice. **Journal of Molecular Histology**, [s. l.], v. 54, n. 3, p. 245–253, 2023.

SAYERS, E. W. *et al.* Database resources of the National Center for Biotechnology Information. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 52, n. D1, p. D33–D43, 2024.

SCARDIGLI, R. *et al.* Direct and concentration-dependent regulation of the proneural gene *Neurogenin2* by *Pax6*. **Development**, [s. l.], v. 130, n. 14, p. 3269–3281, 2003.

SCHINDELIN, J. *et al.* Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. **Nature Methods**, [s. l.], v. 9, n. 7, p. 676–682, 2012.

SCHMOUTH, J.-F. *et al.* Combined serial analysis of gene expression and transcription factor binding site prediction identifies novel-candidate-target genes of *Nr2e1* in neocortex development. **BMC Genomics**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 545, 2015.

SCHOBER, P.; BOER, C.; SCHWARTE, L. A. Correlation coefficients: appropriate use and interpretation. **Anesthesia & Analgesia**, [s. l.], v. 126, n. 5, p. 1763–1768, 2018.

SCHUMACKER, R.; TOMEK, S. **Understanding Statistics Using R**. New York: Springer, 2013.

SCHWARTZ, D. A. The origins and emergence of Zika virus, the newest TORCH infection: what's old is new again. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, [s. l.], v. 141, n. 1, p. 18–25, 2017.

SETH, A. *et al.* *belladonna/(Ihx2)* is required for neural patterning and midline axon guidance in the zebrafish forebrain. **Development**, [s. l.], v. 133, n. 4, p. 725–735, 2006.

SHAHAM, O. *et al.* Pax6: A multi-level regulator of ocular development. **Progress in Retinal and Eye Research**, [s. l.], v. 31, n. 5, p. 351–376, 2012.

SHIMAMURA, K.; RUBENSTEIN, J. L. R. Inductive interactions direct early regionalization of the mouse forebrain. **Development**, [s. l.], v. 124, n. 14, p. 2709–2718, 1997.

SHIMOJO, H.; OHTSUKA, T.; KAGEYAMA, R. Dynamic expression of Notch signaling genes in neural stem/progenitor cells. **Frontiers in Neuroscience**, [s. l.], v. 5, p. [1–7], 2011.

SHIMOZAKI, K. *et al.* SRY-box-containing gene 2 regulation of nuclear receptor tailless (*Tlx*) transcription in adult neural stem cells. **Journal of Biological Chemistry**, [s. l.], v. 287, n. 8, p. 5969–5978, 2012.

SIMPSON, D. I. H. Zika virus infection in man. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, [s. l.], v. 58, n. 4, p. 335–338, 1964.

SINGH, A.; TSONIS, P. A. Focus on molecules: Six3 – master or apprentice? **Experimental Eye Research**, [s. l.], v. 90, n. 5, p. 535–536, 2010.

SLONCHAK, A. *et al.* Noncoding RNA of Zika virus affects interplay between Wnt-signaling and pro-apoptotic pathways in the developing brain tissue. **Viruses**, [s. l.], v. 15, n. 5, p. 1062, 2023.

SONG, B.-H. *et al.* Zika virus: history, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **Journal of Neuroimmunology**, [s. l.], v. 308, p. 50–64, 2017.

SOUZA, C. S. de. **Análise da influência do vírus da Zika sobre a sinalização de ácido retinóico no desenvolvimento craniofacial**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2022.

- STROTTMANN, D. M. *et al.* Genetic and biological characterisation of Zika virus isolates from different Brazilian regions. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 114, n. 7, p. 1–11, 2019.
- SZKLARCZYK, D. *et al.* The STRING database in 2023: protein–protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest. **Nucleic Acids Research**, [s. l.], v. 51, n. D1, p. D638–D646, 2023.
- TAUFER, N. P. **Influência do vírus da Zika sobre a via de sinalização coordenada pelos fatores de transcrição Six1 e Six2 no desenvolvimento cerebral inicial**. 2023. Dissertação (Mestrado em Biologia Celular e do Desenvolvimento) – Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2023.
- TÉTREAU, N.; CHAMPAGNE, M.-P.; BERNIER, G. The LIM homeobox transcription factor Lhx2 is required to specify the retina field and synergistically cooperates with Pax6 for Six6 trans-activation. **Developmental Biology**, [s. l.], v. 327, n. 2, p. 541–550, 2009.
- THAWANI, A. *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, 2018.
- TICCONI, C.; PIETROPOLLI, A.; REZZA, G. Zika virus infection and pregnancy: what we do and do not know. **Pathogens and Global Health**, [s. l.], v. 110, n. 7–8, p. 262–268, 2016.
- TIWARI, S. K. *et al.* Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. **Emerging Microbes & Infections**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. [1–10], 2017.
- TOLE, S.; HÉBERT, J. Telencephalon patterning. *In*: RUBENSTEIN, J. L. R. *et al.* (eds.). **Patterning and Cell Type Specification in the Developing CNS and PNS: Comprehensive Developmental Neuroscience**. 2. ed. London: Academic Press, 2020. p. 23–48.
- TORMAN, V. B. L.; COSTER, R.; RIBOLDI, J. Normalidade de variáveis: métodos de verificação e comparação de alguns testes não-paramétricos por simulação. **Revista HCPA**, Porto Alegre, v. 32, n. 2, p. 227–234, 2012.
- VAN DER LINDEN, V. *et al.* Association of severe hydrocephalus with congenital Zika syndrome. **JAMA Neurology**, [s. l.], v. 76, n. 2, p. 203–210, 2019.
- VIEIRA, S. **Introdução à Bioestatística**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.
- VIEIRA, C. *et al.* Molecular mechanisms controlling brain development: an overview of neuroepithelial secondary organizers. **The International Journal of Developmental Biology**, [s. l.], v. 54, n. 1, p. 7–20, 2010.
- VON FROWEIN, J.; CAMPBELL, K.; GÖTZ, M. Expression of Ngn1, Ngn2, Cash1, Gsh2 and Sfrp1 in the developing chick telencephalon. **Mechanisms of Development**, [s. l.], v. 110, n. 1–2, p. 249–252, 2002.

- VOROU, R. Zika virus, vectors, reservoirs, amplifying hosts, and their potential to spread worldwide: what we know and what we should investigate urgently. **International Journal of Infectious Diseases**, [s. l.], v. 48, p. 85–90, 2016.
- WACHHOLZ, G. E. *et al.* Zika virus-induced brain malformations in chicken embryos. **Birth Defects Research**, [s. l.], v. 113, n. 1, p. 22–31, 2021.
- WANG, T.; XIONG, J.-Q. The orphan nuclear receptor TLX/NR2E1 in neural stem cells and diseases. **Neuroscience Bulletin**, [s. l.], v. 32, n. 1, p. 108–114, 2016.
- WARE, M. *et al.* Regulation of downstream neuronal genes by proneural transcription factors during initial neurogenesis in the vertebrate brain. **Neural Development**, [s. l.], v. 11, n. 1, p. 22, 2016.
- WEN, Z.; SONG, H.; MING, G. How does Zika virus cause microcephaly? **Genes & Development**, [s. l.], v. 31, n. 9, p. 849–861, 2017.
- WICKHAM, H. *et al.* **dplyr: a grammar of data manipulation**. Versão 1.1.4. [S. l.: s. n.], 2023a. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=dplyr>.
- WICKHAM, H. **ggplot2: elegant graphics for data analysis**. New York: Springer-Verlag, 2016. Disponível em: <https://ggplot2.tidyverse.org>.
- WICKHAM, H. *et al.* **svglite: an “SVG” graphics device**. Versão 2.1.3. [S. l.: s. n.], 2023b. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=svglite>.
- WICKHAM, H.; VAUGHAN, D.; GIRLICH, M. **tidyr: tidy messy data**. Versão 1.3.1. [S. l.: s. n.], 2024. Disponível em: <https://cran.r-project.org/package=tidyr>.
- WIKAN, N.; SMITH, D. R. Zika virus: history of a newly emerging arbovirus. **The Lancet Infectious Diseases**, [s. l.], v. 16, n. 7, p. e119–e126, 2016.
- WILCOX, R. R. **Introduction to Robust Estimation and Hypothesis Testing**. 5. ed. London: Academic Press, 2022.
- WILCOX, R. **Modern Statistics for the Social and Behavioral Sciences**. Boca Raton: CRC Press, 2017.
- WILKINSON, G.; DENNIS, D.; SCHUURMANS, C. Proneural genes in neocortical development. **Neuroscience**, [s. l.], v. 253, p. 256–273, 2013.
- XU, D.; XU, Z. Zika virus infection disrupts development of both neurons and glial cells. *In*: MARTIN, C. R. *et al.* (eds.). **Zika virus biology, transmission, and pathways: the neuroscience of Zika virus**. London: Academic Press, 2021. v. 1. p. 189–198.
- YANAGITA, M. BMP antagonists: their roles in development and involvement in pathophysiology. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, [s. l.], v. 16, n. 3, p. 309–317, 2005.
- YE, J. *et al.* Primer-BLAST: A tool to design target-specific primers for polymerase chain reaction. **BMC Bioinformatics**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 134, 2012.

YU, J. *et al.* Nr2e1 downregulation is involved in excess retinoic acid-induced developmental abnormality in the mouse brain. **Biomedical and Environmental Sciences**, [s. l.], v. 30, n. 3, p. 185–193, 2017.

YU, R. T. *et al.* The orphan nuclear receptor Tlx regulates Pax2 and is essential for vision. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, [s. l.], v. 97, n. 6, p. 2621–2625, 2000.

YUN, S. *et al.* *Lhx2* links the intrinsic and extrinsic factors that control optic cup formation. **Development**, [s. l.], v. 136, n. 23, p. 3895–3906, 2009.

ZANLUCA, C.; NORONHA, L.; SANTOS, C. N. D. Maternal-fetal transmission of the Zika virus: an intriguing interplay. **Tissue Barriers**, [s. l.], v. 6, n. 1, p. [1–11], 2018.

ZANLUCA, C.; SANTOS, C. N. D. Zika virus – an overview. **Microbes and Infection**, [s. l.], v. 18, n. 5, p. 295–301, 2016.

ZENG, J. *et al.* The Zika virus capsid disrupts corticogenesis by suppressing Dicer activity and miRNA biogenesis. **Cell Stem Cell**, [s. l.], v. 27, n. 4, p. 618–632, 2020.

ZHANG, W. *et al.* *In utero* infection of Zika virus leads to abnormal central nervous system development in mice. **Scientific Reports**, [s. l.], v. 9, n. 1, p. 7298, 2019.

ZHANG, H. *et al.* Upregulation of microRNA miR-9 is associated with microcephaly and Zika virus infection in mice. **Molecular Neurobiology**, [s. l.], v. 56, n. 6, p. 4072–4085, 2019.

ZHANG, J.; WILLIAMS, M. A.; RIGAMONTI, D. Genetics of human hydrocephalus. **Journal of Neurology**, [s. l.], v. 253, n. 10, p. 1255–1266, 2006.

ZHAO, C. *et al.* A feedback regulatory loop involving microRNA-9 and nuclear receptor TLX in neural stem cell fate determination. **Nature Structural & Molecular Biology**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. 365–371, 2009.

ZUBER, M. E. *et al.* Specification of the vertebrate eye by a network of eye field transcription factors. **Development**, [s. l.], v. 130, n. 21, p. 5155–5167, 2003.