



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS

Faculdade de Ciências Farmacêuticas

RHUBIA SILVEIRA MARTINS ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA INIBIÇÃO DO VÍRUS
DA ZIKA POR MEIO DA ESTIMULAÇÃO DE MICRORNA ENDÓGENO**

CAMPINAS

2023

RHUBIA SILVEIRA MARTINS ROSA

**DESENVOLVIMENTO DE UMA NOVA ESTRATÉGIA PARA INIBIÇÃO DO VÍRUS
DA ZIKA POR MEIO DA ESTIMULAÇÃO DE MICRORNA ENDÓGENO**

Tese apresentada à Faculdade de Ciências Farmacêuticas da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutora em Ciências, na área de Fármacos, Medicamentos e Insumos para a Saúde.

Orientador:
Dr. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

ESTE TRABALHO CORRESPONDE À VERSÃO FINAL
DA TESE DEFENDIDA PELA ALUNA RHUBIA
SILVEIRA MARTINS ROSA, ORIENTADA PELO DR
MARCIO CHAIM BAJGELMAN.

CAMPINAS

2023

Ficha catalográfica
Universidade Estadual de Campinas
Biblioteca da Faculdade de Ciências Médicas
Maristella Soares dos Santos - CRB 8/8402

M366d Martins, Rhubia Silveira, 1992-
Desenvolvimento de uma nova estratégia para inibição do vírus da Zika por meio da estimulação de microRNA endógeno / Rhubia Silveira Martins Rosa. – Campinas, SP : [s.n.], 2023.

Orientador: Marcio Chaim Bajgelman.
Tese (doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

1. MicroRNAs. 2. Zika vírus. I. Bajgelman, Marcio Chaim, 1973-. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Ciências Farmacêuticas. III. Título.

Informações Complementares

Título em outro idioma: Development of a novel strategy for Zika virus inhibition through endogenous microRNA stimulation

Palavras-chave em inglês:

MicroRNA

Zika virus

Área de concentração: Ciências Farmacêuticas: insumos farmacêuticos naturais, biotecnológicos e sintéticos

Titulação: Doutora em Ciências

Banca examinadora:

Marcio Chaim Bajgelman [Orientador]

Clarice Weis Arns

Murilo Vieira Geraldo

Larissa Dias da Cunha

Luiz Felipe Leomil Coelho

Data de defesa: 08-02-2023

Programa de Pós-Graduação: Ciências Farmacêuticas

Identificação e informações acadêmicas do(a) aluno(a)

- ORCID do autor: <https://orcid.org/0000-0002-8235-064X>

- Currículo Lattes do autor: <http://lattes.cnpq.br/6436610501397955>



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
Faculdade de Ciências Farmacêuticas

Autora: RHUBIA SILVEIRA MARTINS ROSA

Orientador: Dr. MARCIO CHAIM BAJGELMAN

Tese aprovada em 08/02/2023

Comissão Examinadora:

Presidente: Dr. Marcio Chaim Bajgelman

Membro 1: Dra. Clarice Weis Arns

Membro 2: Dr. Murilo Vieira Geraldo

Membro 3: Dra. Larissa Dias da Cunha

Membro 4: Dr. Luiz Felipe Leomil Coelho

A ata de defesa com as respectivas assinaturas dos membros encontra-se no SIGA/Sistema de Fluxo de Dissertação/Tese e na Secretaria de Pós-Graduação da Faculdade de Ciências Farmacêuticas.

Campinas, 8 de fevereiro de 2023.

Dedico este trabalho a Deus, à Luiza e à minha família.

"Esta elegantíssima coordenação do sol, das estrelas, dos planetas e dos cometas não podem ter outra origem que o plano e o império do Ser dotado de inteligência e poder, que tudo domina, não como alma do mundo, mas como o Senhor de todas as coisas, eterno, infinito, onipotente, onisciente. Na ausência de qualquer outra prova, um único polegar me convenceria da existência de Deus."

Isaac Newton

AGRADECIMENTOS

À UNICAMP-FCF pela oportunidade acadêmica no programa de pós-graduação e pela bolsa Capes fornecida pelo programa. O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

Ao meu Orientador Dr. Marcio Chaim Bajgelman, pela paciência, dedicação, conhecimentos transmitidos e a confiança depositada na realização deste trabalho.

Ao LNBio – CNPEM pela infraestrutura laboratorial disponibilizada para realização de toda parte experimental desse projeto.

A toda equipe do Laboratório de Vetores Virais pela amizade, trocas de conhecimento e auxílios disponibilizados durante todo desenvolvimento da pesquisa. Agradeço em especial a Dra. Soledad Palameta, a Me. Jessica Toscaro, e Me. Isadora Semionatto pelas contribuições técnicas, científicas e por todo apoio prestado durante as fases experimentais, meninas vocês tornaram essa jornada mais leve.

Ao CNPQ projeto 440379/2016-4 de Kleber Gomes Franchini, pelo apoio em reagentes.

Ao Me. Mike Miller e Dra. Clarice Arns por cordialmente ceder as cepas de Zika vírus utilizadas neste projeto.

Ao laboratório de vetores virais pela preparação de todos os lentivírus utilizados neste trabalho.

Aos laboratórios LVV, LMP e LBE pela disponibilidade de infraestrutura laboratorial e equipamentos utilizados durante análise dos experimentos.

Aos meus familiares que não mediram esforços para me apoiar e contribuir na realização de minha formação pessoal e acadêmica, em especial aos meus pais Silenio e Josiana por todo amor, carinho e apoio incondicional.

Ao meu marido Leonardo por encarar comigo os desafios de se construir uma carreira acadêmica, por todo o amor e apoio demonstrados no decorrer dessa caminhada.

À minha filha Luiza, por mudar minha vida e a minha forma de viver cada dia. Você foi e continua sendo minha maior motivação para enfrentar todos os desafios e dificuldades.

RESUMO

A infecção viral pelo vírus da ZIKA pode resultar em malformações congênitas e neuropatias em recém-nascidos. A última epidemia, acometeu mais de 80 países, entretanto, apesar dos esforços da comunidade científica ainda não existem vacinas ou fármacos antivirais aprovados para uso clínico. A hipótese estudada neste trabalho se baseou na possibilidade de inibir a infecção e replicação viral por meio da estimulação de microRNAs endógenos, que têm como alvo o genoma de RNA positivo do vírus da ZIKA. Dessa forma, inicialmente escolhemos candidatos de microRNA com atividade antiviral utilizando um algoritmo computacional. Estes candidatos foram clonados em vetores lentivirais e utilizados para o estabelecimento de linhagens celulares VERO superexpressando os candidatos de microRNAs humanos. Estas linhagens foram desafiadas com a infecção pelo vírus da ZIKA, de uma cepa brasileira, revelando que 12 candidatos de microRNA apresentaram redução em mais de 50% do efeito citopático e título viral. Numa segunda etapa de nosso trabalho, investigamos a possibilidade de utilizar fármacos para modular candidatos de microRNA endógenos, em células humanas, com objetivo de inibir a infecção e replicação do vírus da ZIKA. Para isso, utilizamos uma plataforma de biologia computacional para escolha de fármacos com potencial de estimular microRNAs com atividade antiviral. Os fármacos candidatos foram testados em cultura de células humanas infectadas com vírus da Zika, verificando a inibição de mais de 90% da atividade viral. Dessa forma, os resultados deste trabalho demonstraram a possibilidade de desenvolver uma nova estratégia antiviral baseada na modulação de mecanismos endógenos da via de RNA de interferência por microRNA endógeno para inibir a infecção e replicação do vírus da ZIKA. Esta nova estratégia também poderá ser explorada para outros vírus de genoma de RNA positivo.

ABSTRACT

Viral infection of ZIKA virus can result in birth defects and neuropathies in newborns.. The last epidemic reached more than 80 countries and despite scientific efforts there are no vaccines or antiviral drugs approved for clinical use. The hypothesis studied in this work was based on the possibility of inhibiting viral infection and replication through the stimulation of endogenous microRNAs, which target the positive RNA genome of the ZIKA virus. Therefore we initially chose microRNA candidates that interact with the viral genome using a computational algorithm. These candidates were cloned into lentiviral vectors and used to establish VERO cell lines overexpressing human microRNA candidates. These strains were challenged with infection by a Brazilian strain of ZIKA virus revealing that 12 microRNAs showed a reduction of more than 50% in the cytopathic effect and viral titer. In a second stage of our work we investigated the possibility of using drugs to modulate endogenous microRNA candidates, in human cells, with the aim of inhibiting the infection and replication of the ZIKA virus. For this, we use a computational biology platform to choose drugs with the potential to stimulate microRNAs with antiviral activity. Candidate drugs were tested in cultured human cells infected with Zika virus, verifying the inhibition of more than 90% of viral activity. Thus, the results of this work demonstrate the possibility of developing a new antiviral strategy based on the modulation of endogenous mechanisms of the interference RNA pathway by endogenous microRNA to inhibit the infection and replication of the ZIKA virus. This new strategy could also be explored for other viruses with a positive RNA genome.

LISTA DE ABREVIATURAS

AGPAT5-1-*acyl-sn-glycerol-3-phosphate acyltransferase epsilon*

AHR- *Aryl hydrocarbon receptor*

BVDV - *Bovine viral diarrhea virus*

CMC - *Carboximetilcelulose*

CPSF1- *Cleavage and polyadenylation specific factor 1*

DMEM - *Dulbecco's Modified Eagle Medium*

DNMT3A- *DNA methyltransferase 3 alpha*

EEEV- *Eastern equine encephalitis virus*

E2F1- *E2F transcription factor 1*

ESRRA- *Estrogen related receptor alpha*

ESRRG- *Estrogen-related receptor gamma*

ETS-*ETS proto-oncogene*

FGF2- *Fibroblast growth factor 2*

FITC- *Fluorescein isothiocyanate*

FOXP3- *Forkhead box P3*

GCR- *Receptor nuclear de glicocorticoides*

GFP- *Green fluorescent protein*

GLIS3- *GLIS family zinc finger 3*

HDF- *Host dependency factor*

HTLV-1 - *Human T-lymphotropic virus 1*

HIF1A- *Hypoxia inducible factor 1 subunit alpha*

IFN-gama- *Interferon gamma*

IL-2 – *Interleucina 2*

IL- 4- *Interleucina 4*

IL-6- *Interleucina 6*

IL-8- *Interleucina 8*

IL-10- *Interleucina 10*

IRF 3 – *Fator regulatório de Interferon 3*

IRF 4 – *Fator regulatório de Interferon 4*

KLF17- *Kruppel-like factor 17*

K1F18B- *Kinesin family member 18B*

LncRNA- *RNA longo não codificante*

LSD1- *Lysine (K)-specific demethylase 1A*
MBD2- *Methyl-CpG binding domain protein 2*
MCAK- *Kinesin family member 2C*
miRNA - *microRNA*
MOI- *Multiplicity of infection*
mRNA – *RNA mensageiro*
MTT - *3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide*
NANOG-*Nanog homeobox*
NDUFA10- *NADH:ubiquinone oxidoreductase subunit A10*
NFKBIA- *NFkB inhibitor alpha*
NF-Kappa-Beta- *Nuclear factor Kappa Beta*
OMS – *Organização mundial de saúde*
PAX 6- *Paired box 6*
PCR – *Polymerase chain reaction*
PIEZO1- *Piezo type mechanosensitive ion channel component 1*
PXR/RXR-Alpha - *Pregnane X receptor/ retinoid X receptor alpha*
RELA-*RELA proto-oncogene, NF-kB subunit*
REXO1- *RNA exonuclease 1*
RISC- *RNA-induced silencing complex*
RNA- *ácido ribonucleico*
RNAi – *RNA de interferência*
RNAv – *RNA viral*
RUNX-*RUNX family transcription factor*
SIRTUIN - *Silent mating type information regulation*
SMAD1 - *SMAD family member 1*
SOX17- *SRY-box transcription factor 17*
STAT1- *Signal transducer and activator of transcription 1*
STAT3- *Signal transducer and activator of transcription 3*
TAL 1 -*TAL bHLH transcription factor 1*
TBX2 - *T-box 2*
TNF-alpha - *Tumor necrosis factor - alpha*
USP20- *Ubiquitin specific peptidase 20*
WHO – *World Health Organization*
WNV - *West Nile virus*

YY1- *YY1 transcription factor*

ZGLP1- *Zinc finger GATA like protein 1*

ZIKV – *Zika virus*

LISTA DE FIGURAS

Figura 1- Mapa epidemiológico mostrando os países atingidos pelo epidemia do vírus da Zika segundo os dados da Organização mundial de saúde.....	18
Figura 2- Biogêneses canônica de moléculas de miRNA	21
Figura 3-- Gel de agarose 2% relativo ao mapa de digestão com enzima de restrição EcoRI mostrando os clones positivos de cada candidato de miRNA clonado no vetor FUGW	36
Figura 4 – Histogramas das citometrias de fluxo das linhagens geneticamente modificadas para expressar o fenótipo miR-GFP.....	39
Figura 5- Expressão dos candidatos de miRNA que apresentam interação com o genoma viral do ZIKV diminuem efeito de citotoxicidade tecidual em células infectadas.	41
Figura 6- Expressão dos candidatos de miRNA que apresentam interação com o genoma viral do ZIKV diminuem título viral.	41
Figura 7-Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína FAM38A.....	43
Figura 8-Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína CPSF160.	43
Figura 9- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína DNMT3A.	44
Figura 10- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína NDUFA10/NADH.	44
Figura 11- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína USP20.....	45
Figura 12- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína AGPAT5/PLCE.....	46
Figura 13- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína KIF18B.....	46
Figura 14- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com LINC01105.....	47
Figura 15-Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína REXO1.....	48
Figura 16- Ensaio in vitro para verificar inibição da infecção viral em cultura de células tratadas com Barberina.	Erro! Indicador não definido.
Figura 17- Ensaio in vitro para verificar inibição da infecção viral em cultura de células tratadas com Tetraciclina.....	Erro! Indicador não definido.
Figura 18- Ensaio in vitro para verificar inibição da infecção viral em cultura de células tratadas com Prednisolona.	61
Figura 19- Tratamento com composto Omeprazol em linhagens celulares humanas não apresentam diminuição expressiva do título viral via modulação de candidatos de miRNA.	Erro! Indicador não definido.
Figura 20- Tratamento com composto Levo-Tiroxina em linhagens celulares humanas apresentam singela diminuição do título viral via modulação de candidatos de miRNA.	64
Figura 21- Modulação positiva dos candidatos de miRNA após tratamento com Berberina, Tetraciclina e Prednisolona	67

LISTA DE TABELAS

Tabela 1- Candidatos de miRNA selecionados a partir da região de interação com porções codificantes das proteínas virais	Erro! Indicador não definido.
Tabela 2- Conjunto de dados preditos usando plataforma de bioinformática METACORE para análise das informações relativas aos candidatos de miRNA selecionados.	48
Tabela 3-Candidatos de miRNA que apresentam interação com o genoma do vírus da Zika obtidos a partir do algoritmo PITA	99
Tabela 4- Sequencia de primers para confirmação de perfil gênico do ZIKV linhagem KU729217	102
Tabela 5- Sequencia de primers dos candidatos de miRNA que foram clonados em vetor FUGW para geração dos lentivírus recombinantes.	102
Tabela 6- Sequencia de primers dos candidatos de miRNA utilizados nos experimentos de Q-PCR.	104

SUMÁRIO

1.INTRODUÇÃO	17
1.1. ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DO VÍRUS DA ZIKA	17
1.2. MIRNAS E OS PROCESSOS DE INFECÇÕES VIRAIS	20
1.3. MIRNA EM ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS - MODULAÇÃO DE MIRNAS ENDÓGENOS PARA CONTROLE DE INFECÇÕES	23
2.OBJETIVOS	26
3.MATERIAIS E METODOS	27
3.1.Vírus	27
3.2.Linhagens celulares	27
3.3.Identificação candidatos miRNAs endógeno com ferramentas de bioinformática	28
3.4.Clonagem dos candidatos de miRNA em vetor lentiviral	28
3.5.Estabelecimento da linhagem VERO-miR positiva	29
3.6.Teste de efeito antiviral mediado pelo miRNA utilizando as linhagens VERO-miR positiva	29
3.7.Estudo in silico para seleção de compostos farmacológicos com potencial para modular os candidatos de miRNA usando a plataforma computacional METACORE	30
3.8.Teste de modulação de miRNA com compostos candidatos em células humanas para verificação de efeito antiviral.....	30
3.9.Ensaio de viabilidade celular com compostos farmacológicos em células humanas.....	32
3.10.Real Time PCR para verificar a modulação dos candidatos de miRNA via compostos farmacológicos em células humanas	32
3.11.Citometria de Fluxo	33
3.12.Análises estatísticas	33
4.RESULTADOS.....	33
4.1.Seleção dos candidatos de miRNA usando algoritmo PITA.....	33
4.2.Seleção dos candidatos de miRNA para os ensaios biológicos	34
4.3.Construção de vetores para superexpressão dos candidatos de miRNA.....	35
4.4.Estabelecimento das linhagens celulares que expressam os candidatos de miRNA.	37
4.5.Ensaio para avaliação do efeito antiviral mediado pelos miRNAs utilizando as linhagens VERO-miR positivas.	40
4.6.Seleção de compostos candidatos com potencial modulatório de miRNA usando a plataforma METACORE.....	42
4.7. . Ensaio para avaliação do efeito antiviral mediado pelos miRNAs endógenos induzidos por compostos candidatos.....	52
4.8.Explorando a correlação da modulação farmacológica de miRNAs endógenos e efeito antiviral	64

5.DISSCUSSÃO	68
6.CONCLUSÃO.....	85
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	86
ANEXO 1 -Material complementar	99

1. INTRODUÇÃO

1.1. ASPECTOS GERAIS E EPIDEMIOLÓGICOS DO VÍRUS DA ZIKA

O vírus da Zika (ZIKV) é um arbovírus que ganhou atenção mundial na epidemia de 2015-2016 apresentando ocorrências relevantes de malformações congênitas e neuropatias em recém-nascidos de mulheres infectadas durante o período gestacional (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; GULLAND, 2016).

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* e a família *Flaviviridae* e pode ser caracterizado como um vírus envelopado, formado por uma bicamada lipídica de 50 nm de diâmetro, que contém no seu interior um capsídeo icosaédrico onde o genoma encontra-se inserido. O genoma é composto por uma molécula de RNA fita simples de aproximadamente 11Kb de comprimento que codifica uma poliproteína. Esta poliproteína é clivada em 3 proteínas estruturais (C, prM e E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2a, NS2b, NS3, NS4a, NS4b e NS5), que apresentam funções variadas como nos processos de replicação e empacotamento, e evasão da resposta imune celular (FAYE et al., 2014; KUNO; CHANG, 2007; MCARTHUR, 2017; RABAAN et al., 2017).

Historicamente, o vírus foi descoberto em uma floresta denominada *Zika* em Uganda na África e por um período de seis décadas manteve-se como apenas um agente patológico negligenciado, visto o baixo número de ocorrências de infecções em populações isoladas das regiões da África tropical e sul da Ásia (BARROWS et al., 2016; DICK, 1952). Esse cenário apresentou mudanças a partir do ano 2007 quando se iniciaram os grandes surtos infecciosos por ZIKV, atingindo as regiões da Micronésia, Polinésia Francesa e América do Sul entre 2007 e 2015 (BAUD et al., 2017; DUFFY et al., 2009; FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; ROTH et al., 2014).

Ao atingir o continente americano observou-se um aumento rápido e inesperado de transmissões autóctones do vírus, assim como o aumento de casos reportados de malformações congênitas e síndromes neurológicas graves entre os pacientes infectados, iniciando uma situação de emergência pública internacional, declarada pela OMS no ano de 2016 (GULLAND, 2016; LESSLER et al., 2016).

Durante o período de 2015-2017 casos de infecções pelo ZIKV foram

reportados em 84 países (Figura 1), dois quais 31 demonstraram aumento no número de doenças neurológicas associadas a infecção com o vírus. Apesar do declínio no número de infecções reportadas a partir de 2017, o vírus continua circulante em países que não foram atingidos durante a epidemia de 2015 (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019; WHO, 2019).

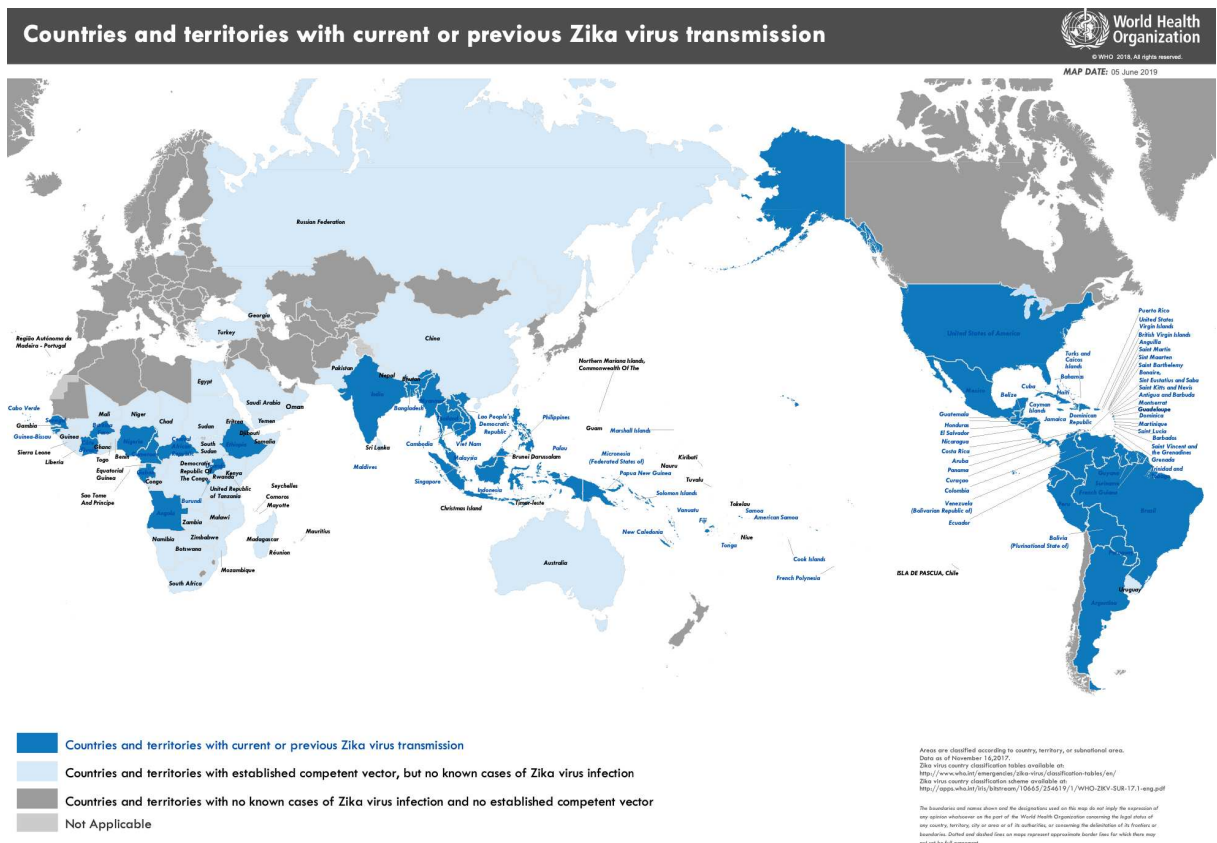


Figura 1- Mapa epidemiológico mostrando os países atingidos pela epidemia do ZIKV segundo os dados da Organização mundial de saúde. O mapa demonstra os países que apresentaram transmissão previa ou atual do ZIKV, onde os países assinalados em azul escuro indicam os territórios com transmissão previa ou atual do ZIKV, países assinalados de azul claro indica territórios que apresentam disseminação do mosquito transmissor do vírus e que não tiveram casos registrados de transmissão pelo ZIKV, países marcados com a cor cinza escuro representam os territórios que não apresentaram casos de infecção pelo ZIKV e que não possuem disseminação do vetor; países marcados com a cor cinza claro nenhuma das opções acima se mostram aplicáveis. Os dados apresentados no gráfico acima foram atualizados em junho de 2019. Figura adaptada de (WHO, 2019b).

A principal forma de transmissão viral acontece através da picada de mosquitos infectados do gênero *Aedes* (HAMEL et al., 2015). Esses vetores apresentam um padrão de incidência alto nas principais regiões afetadas pelos surtos infecciosos, principalmente o Brasil, onde o clima tropical favorece sua reprodução, e por esse motivo podem ser considerados como os responsáveis pela rápida e ampla distribuição geográfica alcançada pelo ZIKV entre 2015 a 2017 (HAMEL et al., 2016;

MCARTHUR, 2017). Ao contrário de outros vírus da mesma família, outras formas de contágio envolvendo a disseminação viral via pessoa-pessoa também foram relatadas para o ZIKV, como transmissões por relações sexuais com pessoas infectadas e transmissão perinatal entre mãe e feto (LYLE PETERSON et al., 2016; MUSSO, 2015).

Infecções pelo ZIKV caracterizam-se por serem majoritariamente assintomáticas, onde apenas uma pequena parcela da população infectada irá apresentar sintomas clínicos brandos como febre, conjuntivite, mialgia, dor de cabeça e erupções maculopapulares (DUFFY et al., 2009). Contudo durante os grandes surtos infecciosos foi descoberto que o vírus também poderia levar ao desenvolvimento de quadros clínicos mais graves envolvendo a síndrome congênita do vírus da Zika e síndrome de *Guillain-Barré* (WORLD HEALTH ORGANIZATION(WHO), 2017).

A síndrome congênita do vírus da Zika foi responsável pela identificação de anormalidades no ultrassom de mais de 40% dos fetos de gestantes infectadas pelo vírus no Brasil (BRASIL et al., 2016), assim como no aumento da taxa de ocorrência de microcefalia de 1 para cada 100 mulheres grávidas infectadas na Polinésia Francesa (CAUCHEMEZ et al., 2016). Essa síndrome apresenta um fenótipo variável onde estão presentes o desenvolvimento de calcificações cerebrais, microcefalias, restrições de crescimento intrauterino e mortes fetais. Além destes fenótipos, estudos recentes mostraram que recém-nascidos de mulheres infectadas pelo ZIKV e que haviam apresentado circunferência cerebral normal durante o período de desenvolvimento gestacional apresentaram problemas neurológicos severos após o parto, como epilepsia, desabilidades motoras severas, perda de audição e problemas na visão (GHARBARAN; SOMENARAIN, 2017; VAN DER LINDEN et al., 2016).

Uma fração pequena de casos mais graves foi reportada em adultos envolvendo o desenvolvimento de meningites e encefalites, assim como, síndrome de *Guillain-Barré* (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019).

A terapêutica consiste apenas no tratamento dos sintomas apresentados pelos pacientes, não existindo agentes com ação antiviral ou vacinas aprovadas para o uso em humanos (FERRARIS; YSSEL; MISSÉ, 2019).

Apesar do grande acervo científico sobre o ZIKV que foi adquirido nos últimos anos, ainda existem muitas lacunas de conhecimento em relação à sua biologia que levaria ao desenvolvimento dos casos graves, como a malformação em recém-nascidos, que justifica, portanto, os esforços científicos no desenvolvimento de novas abordagens exploratórias para investigar mecanismos da biologia viral e patogenicidade.

Neste sentido, em adição à mecanismos ligados à resposta imunológica, outras abordagens moleculares podem fornecer informações relevantes. Estudos apontam que miRNAs podem participar na mediação das respostas entre vírus e hospedeiro podendo desempenhar um papel fundamental na patogênese viral (MCLEAN et al., 2017). Casos bem elucidados de outras famílias virais mostram que vários miRNAs, que são expressos de forma endógena nas células, podem atuar tanto para inibir a replicação do vírus quanto para favorecer essa replicação através da modulação de fatores celulares ou de interações diretas com o genoma do vírus, como é o caso do miR-28 que inibe o Vírus-T linfotrópico humano do tipo 1 (HTLV-1) e o miR-122 que favorece a replicação do vírus da Hepatite C (BAI; NICOT, 2015; SCHULT et al., 2018). Pouco conhecimento foi adquirido nesta área nas infecções envolvendo o ZIKV, assim entender como este vírus modularia a maquinaria de miRNAs para favorecer sua replicação abriria novos caminhos de estratégias terapêuticas.

1.2. MiRNAs E OS PROCESSOS DE INFECÇÕES VIRAIS

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes que possuem aproximadamente 22 nucleotídeos de comprimento e que são sintetizadas pela maquinaria celular atuando como RNA de interferência (RNAi) endógeno para modular a expressão gênica (BARTEL, 2004).

A biogênese canônica dos miRNAs envolve a transcrição destas moléculas pela enzima RNA polimerase II no núcleo das células (Figura 2). O produto dessa reação irá gerar uma molécula com estrutura de *hairpin* de aproximadamente 70nt denominado pri-miRNAs. Os pri-miRNAs gerados irão interagir com o complexo *DGCR8-Drosha* no qual passarão por um processo de clivagem e formarão um duplex de aproximadamente 22 nt de comprimento denominados pré-miRNAs. Moléculas de pré-miRNA serão exportados para o citoplasma e clivados pela enzima *Dicer* para

retirada da estrutura de *hairpin* gerando um duplex de miRNAs. Uma das fitas do miRNA será selecionada ao ser acoplada pela enzima *AGO* seguido pela formação do complexo *RISC*. Uma vez formado, o complexo *RISC* será guiado pela fita de miRNAs até seu alvo nos RNAs mensageiros (mRNA) que apresentarem complementaridade com a região *seed* (porção de nucleotídeos 2 -7 da região 5' da molécula de miRNA). De acordo com o nível de complementaridade o miRNA irá direcionar a clivagem da molécula de mRNA ou reprimir a transcrição desta através do acoplamento das proteínas do complexo *RISC* (BARTEL, 2004; CULLEN, 2006).

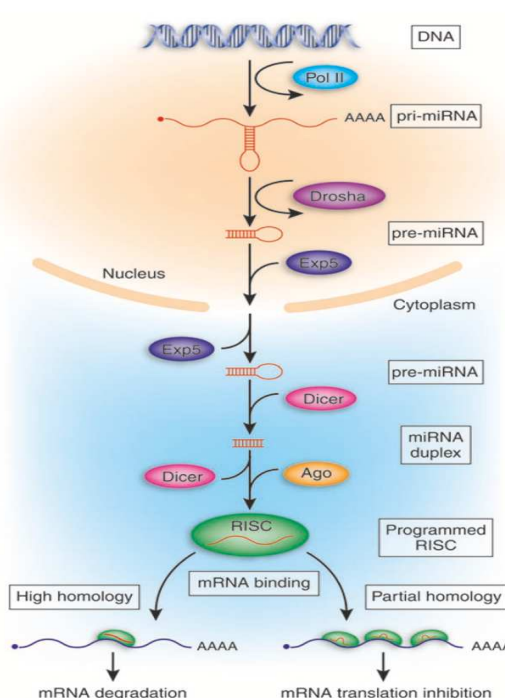


Figura 2- Biogêneses canônica de moléculas de miRNA. Figura ilustrativa do processo de biogêneses das moléculas de miRNA que foi adaptado visando simplificar a ilustração descrevendo apenas os fatores celulares mais importantes. Adaptado de (CULLEN, 2006)

Modelos não canônicos de formação de moléculas de miRNAs também podem ser descritos na literatura, onde estas são geradas na ausência das principais enzimas descritas acima como *Drosha*, *Dicer* e *AGO*. Geralmente miRNAs que seguem esses modelos são provenientes de outros organismos, podendo até mesmo ter origens virais (CIPOLLA, 2014).

Segundo informações divulgadas por uma plataforma de banco de dados especializada em miRNAs, denominada miRBase, atualmente existem mais de 2000 moléculas precursoras de miRNA no genoma humano com potencial para regular milhares de alvos, inclusive transcritos virais (GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018).

Assim como as células dispõem dos miRNAs para gerenciar o microambiente celular e manter a homeostase, uma vez infectadas, os vírus utilizam ferramentas e mecanismos dispostos pela maquinaria celular para favorecer sua replicação e gerar novas partículas virais. Valendo-se desses mecanismo, os vírus modificam o perfil dos miRNAs circulantes buscando favorecer o microambiente celular para sua expansão clonal (BRUSCELLA et al., 2017). Na maioria dos casos essa mudança de perfil de expressão de miRNAs está diretamente relacionada com a patogenicidade viral. Uma das formas de se entender se determinado miRNA possui relevância ou possível interação com os vírus é saber se estes tiveram seus níveis basais suprimidos ou aumentados em células infectadas (GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018).

Estudos foram desenvolvidos visando entender as mudanças de perfil de miRNAs em diferentes linhagens celulares que poderiam explicar a patogenicidade causada pela infecção com o ZIKV. Dentre esses estudos foi possível verificar que células progenitoras neuronais infectadas com vírus apresentam um aumento na expressão dos miRNAs miR-155, miR-203, miR-29 e miR-145, moléculas ligadas as vias de respostas neuroinflamatórias, regulação de células T CD4⁺ e CD8⁺, maturação e expansão de células *Natural Killer*, produção de citocinas e quimiocinas, assim como ativação das vias de *Interferon*, expressão de receptores virais e regulação de vias do desenvolvimento embrionário (AZOUZ et al., 2019; CASTRO et al., 2019). Da mesma forma, outros estudos apontaram a supressão do miR-126-5p, que atuaria como um importante regulador da replicação de flavivírus em diferentes modelos experimentais (CASTRO et al., 2019). Uma vez que se tenha conhecimento a respeito dos perfis de miRNAs que são relevantes para expressão de determinada patogenicidade é possível buscar alternativas terapêuticas para conseguir recuperar o perfil gênico das células infectadas e restaurar sua funcionalidade.

Um exemplo clássico de recuperação da funcionalidade celular através do modelamento de miRNAs é a do miR-122 em células infectadas com o vírus da hepatite C. Neste caso foi possível verificar experimentalmente que células do fígado infectadas com o vírus da hepatite C apresentavam uma alta expressão da molécula miR-122, estudos mais aprofundados mostraram que esta molécula teria complementariedade e conseguiria interagir em duas regiões da porção 5' da molécula de RNA viral (RNAv). Essa interação levaria a um aumento da estabilidade

do genoma viral de tal forma que a replicação do vírus passaria a ocorrer apenas na presença deste miRNA. Através desta informação foi possível elaborar estratégias usando moléculas sintéticas complementares ao miR-122 denominadas antimirs para bloquear a replicação viral e recuperar a funcionalidade das células infectadas (GEBERT et al., 2014; SCHULT et al., 2018).

Estudos semelhantes conseguiram identificar moléculas de miRNA que exercem papel importante para o sequestro das principais funções das células a favor da síntese viral, como é o caso dos miRNAs miR-17 e miR-142 que possuem papel pró-viral para os vírus da diarreia viral bovina (BVDV) e encefalite equina do leste (EEEV) respectivamente (GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018; SCHEEL et al., 2016; TROBAUGH et al., 2014).

Além de miRNAs que interagem de forma direta no genoma viral para modular funções importantes ao vírus, estudos também tem demonstrado que moléculas de miRNA que interagem com mRNA do hospedeiro modulam a expressão de proteínas endógenas favorecendo a replicação viral, porém de uma forma indireta, como é o caso das moléculas de miR-532 e miR-144 para as infecções com o vírus do Oeste do Nilo (WNV) e vírus Influenza (GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018; ROSENBERGER et al., 2017; SLONCHAK et al., 2016).

À medida que se aumenta o conhecimento a respeito da modulação de fatores importantes para síntese viral através das moléculas de miRNA mais alternativas terapêuticas podem ser buscadas para bloquear a ação dos vírus e diminuir possíveis efeitos patológicos destes.

1.3. MiRNA EM ESTRATÉGIAS TERAPÊUTICAS - MODULAÇÃO DE MiRNAs ENDÓGENOS PARA CONTROLE DE INFECÇÕES

Os modelos padrões de estratégias terapêuticas para o combate a infecções virais se baseiam no desenvolvimento de vacinas ou na busca de moléculas químicas que conseguiriam interagir com as principais proteínas funcionais, receptores virais, polimerases e proteases virais (CLERCQ; E., 2016; TAGUWA et al., 2019). Apesar do vasto conhecimento adquirido ao longo dos anos usando esse tipo de metodologia, ainda observamos limitações vinculadas ao seu uso, como o longo e laborioso tempo do processo de busca e desenvolvimento de novos fármacos e vacinas funcionais, o alto custo do processo, e algumas particularidades virais.

No caso de fármacos antivirais por exemplo, uma das limitações é o fato de que se o bloqueio do ciclo viral não atingir seu potencial máximo, essas moléculas terão seus efeitos neutralizados à medida que o vírus evoluir ao sofrer mutações no seu genoma (CLERCQ; E., 2016). Da mesma forma, as vacinas encontram limitações ao envolverem famílias virais que apresentem vários sorotipos de um determinado vírus, onde a imunização precisa atingir todos os sorotipos virais para evitar o agravamento da infecção como no caso da dengue (SUN et al., 2017).

Com o aumento do conhecimento molecular dos ciclos virais assim como da biogênese celular, alternativas terapêuticas emergiram, sendo o uso de miRNAs um dos campos em ascensão. Por se tratarem de moléculas de RNA, que podem ser facilmente sintetizadas e que apresentam uma maior facilidade de informações através do uso das ferramentas de bioinformática e dos bancos de dados disponíveis, um número crescente de pesquisas tem sido desenvolvido visando tornar essas moléculas fonte de novos e mais eficientes agentes terapêuticos (BRUSCELLA et al., 2017; GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

Além disso, é necessário um número pequeno de complementariedade de bases entre miRNAs e o genoma viral. Dessa forma, uma variedade de miRNAs produzidos pelas células para modulação da maquinaria própria poderiam ser investigados como candidatos, valendo-se das ferramentas disponíveis, em relação a sua capacidade de interagir e inativar o ciclo viral (GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018). Ainda, o acesso aos bancos de dados específicos para essa classe de moléculas facilitaria a busca por miRNAs que pudessem interagir em regiões específicas do genoma viral, como as regiões denominadas fatores de dependência do hospedeiro (*host dependency factor* - HDF) que por serem essenciais ao vírus dificilmente sofreriam seleção de mutações virais (ARBUTHNOT, 2011; TAGUWA et al., 2019).

Estudos têm sido desenvolvidos nesse campo, como exemplo específico para os flavivírus podemos citar pesquisas que tem mostrado a modulação de alguns miRNAs como o miR-484 e o miR-744, endogenamente encontrados em células sanguíneas e de macrófagos. Quando modulados para aumentar suas expressões nestas células esses candidatos de miRNA induziriam a inibição da replicação viral para os quatro sorotipos do vírus da Dengue (CASTRILLÓN-BETANCUR; URCUQUI-

INCHIMA, 2017). Da mesma forma, miRNAs correspondentes a família do miR-34 também poderiam ser modulados para combater a infecção viral, visto que essa família de moléculas atuam endogenamente como reguladores da resposta de *interferon*, potencializando seu sinal ao articular a fosforilação do IRF3 (fator 3 regulatório de *interferon*) nas células infectadas (SMITH et al., 2017).

O uso de miRNAs como agentes terapêuticos tem envolvido duas vertentes principais, a primeira delas seria os miRNAs *mimics*, moléculas de miRNAs sintéticas cujo tratamento levaria ao aumento da expressão celular destes e consequente recuperação da regulação de atividades celulares importantes e/ou inibição do ciclo viral. Enquanto o segundo modelo, seriam moléculas denominadas *antimirs*, moléculas sintetizadas para serem complementares aos miRNAs endógenos com o objetivo de bloquear suas funções nas células-alvo (HANNA; HOSSAIN; KOCERHA, 2019; RUPAIMOOLE; SLACK, 2017).

Cada linhagem celular apresenta um conjunto de miRNAs próprios que são responsáveis por regular suas funções de maneira específica e seletiva. Aproximadamente 100 diferentes moléculas de miRNAs são expressas a níveis funcionais em cada linhagem celular (GIRARDI; LÓPEZ; PFEFFER, 2018). Por serem moléculas com um padrão de modulação sensível a fatores externos, a expressão seletiva de determinadas moléculas na célula poderia ser aumentada ou reprimida de forma intencional como resposta terapêutica a determinado problema (VAN METER; ONYANGO; TESKE, 2020).

Dessa forma, ao modular a expressão de miRNAs endógenos, como modelo terapêutico, estaríamos contornando problemas de estabilidade e biodistribuição fisiológica, assim como poderíamos investir em modelos que pudessem ser aplicados para profilaxia.

Ao aplicarmos essa estratégia baseada na utilização de miRNAs para inibição viral, entendemos que ela poderia apresentar algumas vantagens. Como mencionado anteriormente, é necessária uma pequena região de bases complementares para que o miRNA consiga interagir e silenciar a transcrição de RNAs alvo. Muitas das moléculas endógenas poderiam ter complementariedade com genomas virais e serem usadas a nosso favor para bloquear seu ciclo na célula, e é

possível explorar o caso da especificidade celular, em que miRNAs expressos unicamente em linhagens celulares importantes ao vírus que seriam moduladas.

Entendemos que ao infectar as células os vírus acabam por sequestrar sua maquinaria, e induzir que esta funcione a seu favor. Contudo o uso da modulação de miRNAs poderia ser uma poderosa ferramenta para exploração de novas abordagens terapêuticas dirigidas a profilaxia e tratamento antiviral. No caso dos flavivírus, principalmente daqueles envolvidos com o desenvolvimento de quadros graves como encefalites, meningites e síndromes congênitas a profilaxia induzida através da modulação de miRNAs poderia ser um importante avanço terapêutico.

Neste projeto, planejamos investigar a atividade de moléculas de miRNAs que poderiam ser induzidos a partir do tratamento com fármacos acessíveis a população e que conseguiriam interagir com o genoma viral do ZIKV, e assim atenuar ou mesmo inibir a replicação viral, tendo como consequência o bloqueio da progressão da infecção viral.

2. OBJETIVOS

O alvo central deste projeto é explorar o potencial antiviral da modulação de miRNAs endógenos que tenham como alvo o genoma do ZIKV através da indução farmacológica do aumento da expressão dessas moléculas a nível celular. Para isso, planejamos cumprir os seguintes objetivos:

2.1. Identificar sequências alvo de miRNA humano no genoma do ZIKV.

2.2. Investigar atividade antiviral mediada pela superexpressão de miRNAs humanos em células VERO geneticamente modificadas com alvo de potencializar o efeito antiviral.

2.3. Prospectar compostos farmacológicos *in silico*, usando ferramentas de bioinformática para elencar compostos candidatos e/ou associações que possibilitam a indução de miRNAs de interesse em células humanas.

2.4. Investigar a indução farmacológica de miRNAs em células-alvo humanas de interesse.

2.5 Verificar potencial de inibição viral utilizando a estratégia de controle transcricional mediada por miRNAs farmacologicamente induzido.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1. Vírus

O trabalho foi desenvolvido usando uma cepa viral isolada no Brasil, ZIKV KU729217, gentilmente cedida pela Prof. Dra. Clarice Weis Arns da Universidade Estadual de Campinas (UNICAMP). A amostra viral foi expandida e titulada em células VERO (ATCC® CCL-81™) para gerar um estoque viral próprio que foi utilizado durante todas as fases experimentais. A identidade viral foi checada por meio de RT-PCR do genoma utilizando-se primers com sequências desenhadas para amplificar fragmentos das regiões E e NS1. O RNA viral foi isolado com kit *QIAamp Viral RNA Mini Kit* (ID:52904) da Quiagen, seguindo protocolo do fabricante. Os *primers* para amplificação por PCR e respectiva região alvo de interação no genoma estão listados na tabela 4 em anexo. Para a produção do estoque viral as cepas foram passadas em células VERO. As células foram semeadas à uma concentração de 6×10^6 em placa de cultura de 100mm formando uma monocamada de células e infectadas com o vírus estoque utilizando MOI de 0,05. Após a adição do vírus as células foram mantidas em cultura por um período 48 horas em estufa 37 °C e 5% CO₂ e os sobrenadantes foram coletados, seguido de uma etapa de centrifugação 400g por 5 minutos para retirada dos *debris* celulares. Os sobrenadante coletados foram titulados por ensaio de formação de placa. Foram realizadas 3 passagens para produzir os estoques utilizados no trabalho. As amostras do estoque foram mantidas em alíquotas de 250µL em freezer -80°C, seguindo todas as medidas de biossegurança.

3.2. Linhagens celulares

Nos experimentos *in vitro* foram utilizadas as linhagens VERO (ATCC® CCL-81™) células epiteliais de rim de macaco; VERO-miR-GFP (produzida no Laboratório de Vetores Virais) que continham o gene de expressão de GFP em associação aos candidatos dos miRNAs selecionados; SH-SY5Y (ATCC® CRL-2266™) células epiteliais de neuroblastoma humano; A549 (ATCC® CCL-185™) células epiteliais de carcinoma pulmonar humano; HT-1080 (ATCC® CCL-121™) células epiteliais de fibrosarcoma de tecidos conectivos humano; HUH-7 (ECACC 01042712™) células epiteliais de hepatocarcinoma humano; MCF-7 (ATCC® HTB-22™) células epiteliais de carcinoma de mama humano. Essas células foram mantidas em placas de 100mm utilizando meio DMEM (Gibco®) suplementados com glutamina

e 10% de soro fetal bovino (Vitrocell®) em estufa 37°C e 5% CO₂ por até 12 passagens.

3.3. Identificação dos candidatos de miRNAs endógeno com ferramentas de bioinformática

A identificação dos candidatos de miRNA foi feita usando o algoritmo computacional PITA (Weizman Institute – Israel) que correlacionou os candidatos de miRNA humanos depositados no banco de dados mirBase com o genoma viral do ZIKV, variante brasileira KU729217, depositado no GenBank. O algoritmo possui licença gratuita e foi utilizado na plataforma online disponibilizada pelo instituto de Weizman. Utilizou-se como parâmetros de seleção a busca por miRNAs que apresentavam interação completa de 7 pares de bases da região *seed* e alvos que estivessem localizados nas porções não codificantes 5' e 3' e ao longo das regiões codificantes do genoma viral. Os candidatos que apresentaram complementariedade com o genoma viral foram ordenados em uma tabela em função do número de interações que estes teriam com o genoma viral e em função da estabilidade dessa interação. Essa etapa de bioinformática foi realizada em colaboração com o Dr. Paulo Oliveira, especialista de biologia computacional do LNBio/CNPEM. A lista de candidatos gerada com o algoritmo computacional foi posteriormente analisada manualmente para selecionar candidatos específicos que interagiam em função da região de complementariedade com o genoma viral do ZIKV nas regiões codificantes de cada uma das proteínas virais E, prM, C, NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5.

3.4. Clonagem dos candidatos de miRNA em vetor lentiviral

Desenhemos oligonucleotídeos, por meio de processo manual, que flaqueavam a região do *steem-loop* dos pri-miRNAs, contendo ~100pb a jusante e ~100pb a montante, para cada candidato de miRNA (Tabela 5 em anexo). Os oligos foram sintetizados pela empresa Exxtend, Paulínia-SP. Os fragmentos de DNA contendo as sequências de interesse foram amplificados pela metodologia de *polymerase chain reaction* (PCR) usando kit da Promega (M3001) e protocolo descrito pelo fornecedor, usando como *template* DNA extraído de células 293T (**ATCC® CRL-3216™**). Uma vez amplificados o DNA de interesse foi extraído do gel de agarose, digerido com enzima de digestão EcoRI ([NEB #R3101](#)) da New England Biolabs, e clonado em vetor lentiviral FUGW (14883) da Addgene. Os candidatos de miRNA

foram clonados no vetor lentiviral FUGW, a jusante do gene repórter eGFP. Para alguns casos foi feita uma etapa de subclonagem do inserto contendo o genoma do miRNA de interesse no vetor pGEM®-T Easy (A137A) da Promega antes de realizar a clonagem final no vetor FUGW. Essa etapa de subclonagem foi realizada visando melhorar o número de clones positivos obtidos na clonagem final.

3.5. Estabelecimento da linhagem VERO-miR positiva

Para o estabelecimento das células permissíveis que continham os miRNAs de interesse utilizou-se células VERO (ATCC® CCL-81™), plasmídeo FUGW (NALDINI et al., 1996a, 1996b), e lentivírus produzidos pelo Laboratório de Vetores Virais LVV/LNBio, com protocolo adaptado da literatura (BAJGELMAN; COSTANZI-STRAUSS; STRAUSS, 2003; STRAUSS et al., 2006). As células VERO foram semeadas usando uma concentração de 2×10^5 células em placa de 35mm no dia anterior à transdução, transduzidas utilizando MOI de 10 com os lentivírus recombinantes e polibreno 8 µg/mL *overnight* e feita expansão em placas de 60mm e 100mm à medida que as células adquiriam confluência. O *pool* de células permissíveis com expressão de GFP e do candidato de miRNA passou então por um processo de seleção de colônias. Nesta etapa o *pool* de células foi replaqueado a uma concentração de 2×10^3 células em placa de 100mm e foram mantidas em cultura até o aparecimento de colônias visíveis. Uma vez formadas, as colônias foram selecionadas com o auxílio de microscópio de fluorescência para aquelas que melhor expressaram o fenótipo GFP positivo. Elas foram isoladas e transferidas para uma nova placa utilizando a sucção de uma ponteira de 1000µL sobre a colônia. Após esse processo foi realizado a expansão das colônias selecionadas em placas de 60mm e 100mm à medida que as células adquiriam confluência. Foram realizados ensaios de citometria de fluxo durante cada passagem das células de forma a se avaliar a presença do novo fenótipo nas células.

3.6. Teste de efeito antiviral mediado pelo miRNA utilizando as linhagens VERO-miR positiva

Para o teste de efeito antiviral mediado pelo miRNA foram utilizadas células VERO-miR positivas (células permissíveis estabelecidas), e VERO parental (controle negativo); e o ZIKV KU729217. A metodologia utilizada para avaliação foi de TCID₅₀. As células foram semeadas a uma concentração de 1×10^4 células por poço em placa de 96 poços no dia anterior à infecção, infectadas com o ZIKV utilizando uma diluição

seriada de 10^{-1} a 10^{-10} e mantidas em incubação por 6 dias a 37°C em estufa 5% CO₂. Para o plaqueamento foi utilizado meio DMEM acrescido de glutamina e 10% soro fetal bovino, para infecção com vírus utilizou-se meio DMEM acrescido de glutamina e 2% soro fetal bovino. Após o período de incubação a monocamada de células de cada poço foi observada em microscópio óptico e contabilizados os poços que apresentaram efeito citopático.

3.7. Estudo *in silico* para seleção de compostos farmacológicos com potencial para modular os candidatos de miRNA usando a plataforma computacional METACORE

Para prever os compostos farmacológicos que poderiam modular a expressão dos miRNAs em células humanas foi utilizado o sistema METACORE. Este *software* consegue conectar uma gama de informações a nível celular e molecular através de plataformas de bancos de dados próprias e externas e gerar a partir disso *networks* correlacionando essas interações com o alvo de interesse. Nessa etapa experimental inicialmente identificamos quais as proteínas em que os candidatos de miRNA de interesse estariam presentes na região intrônica. Uma vez tendo conhecimento de quais proteínas os miRNAs estariam vinculadas passamos para etapa de geração dos *networks*. Os *networks* foram gerados realizando a busca das proteínas no parâmetro *auto-expanding*. A análise dos *networks* gerados foi realizada selecionando as vias que teriam interação com a proteína de forma direta ou em até dois nodos de distância. Uma vez conhecida as vias que teriam interação com o alvo foram efetuadas as buscas de possíveis compostos que funcionariam como ativadores destas vias utilizando o parâmetro *drug look-up*.

3.8. Teste de modulação de miRNA com compostos candidatos em células humanas para verificação de efeito antiviral

Para o teste de efeito antiviral mediado pela modulação do miRNA via tratamento com compostos candidatos, efetuamos ensaios *in vitro*, utilizando cultura de células (item 3.2) SHSY-5Y; A549; HT-1080; HUH-7; MCF-7, e o ZIKV KU729217. A metodologia consistiu em duas etapas, na primeira as células humanas foram infectadas e tratadas com os compostos selecionados. Na segunda etapa os sobrenadantes coletados ao final do período de incubação/ tratamento dessas células

foram titulados por ensaio de placa em células VERO. As células A549; HT-1080; HUH-7 foram semeadas em placa de 24 poços a uma concentração de 2×10^5 células por poço, as células MCF-7 foram semeadas a uma concentração de 3×10^5 células por poço, e as células SHSY-5Y foram semeadas a uma concentração de 7×10^5 células por poço, ambas no dia anterior à infecção. Após aderirem à placa, foi feita a troca do meio de cultura e os compostos foram adicionados iniciando o pré-tratamento. As concentrações de tratamento utilizadas foram 5, 10, 20 40 μM para tratamento com Berberina e Levo-Tiroxina; 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg/mL para tratamento com Tetraciclina; e 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/mL para tratamento com Prednisolona; e 10, 20, 40 μM para os tratamentos com Omeprazol. Em nosso trabalho a concentração de Tetraciclina e Prednisolona é descrita em mg/mL seguindo a descrição de estudos *in vitro* da literatura (NUZZI et al., 2012; ROTHAN et al., 2013), enquanto Berberina, Levo-Tiroxina e Omeprazol são apresentados em μM por ser essa a faixa de concentrações preferível para estudos *in vitro* ainda não reportados. No dia seguinte as células foram infectadas com o ZIKV utilizando MOI de 5 e mantidas em incubação por 1 h à 37°C em estufa 5% CO₂. Após esse período foi feita a troca do meio de cultura e as células foram mantidas em incubação por 48 h à 37°C em estufa 5% CO₂. Após as 48h o sobrenadante de cada condição experimental foi coletado. O tratamento com os compostos foi mantido durante todas as etapas experimentais.

Para a etapa de titulação células VERO foram semeadas a uma concentração de 1×10^5 células por poço em placa de 24 poços no dia anterior à infecção. A infecção foi realizada utilizando uma diluição seriada (10^{-1} a 10^{-4}) dos sobrenadantes coletados, as células foram mantidas incubando por 1 h à 37°C em estufa 5% CO₂ e após esse período foi realizado a troca do meio, adicionando meio CMC (carboximetilcelulose) 3%. Após adição do meio viscoso CMC 3% as células foram mantidas em incubação por 6 dias à 37°C em estufa 5% CO₂ onde ao final desse período elas foram fixadas com paraformaldeído 10%, lavadas para retirada do meio e coradas com cristal violeta 1%. As placas de lise foram contabilizadas e o título viral estimado. Para o plaqueamento foi utilizado meio DMEM acrescido de glutamina e 10% soro fetal bovino, para infecção com vírus utilizou-se meio DMEM acrescido de glutamina e 0% soro fetal bovino, para o período de incubação utilizou-se meio DMEM acrescido de glutamina e 2% soro fetal bovino e para o ensaio de placa utilizou-se CMC 3% acrescido de DMEM, glutamina e 2,5 % soro fetal bovino.

3.9. Ensaio de viabilidade celular com compostos farmacológicos em células humanas.

Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7) foram semeadas em placa de 96 poços na concentração de 4×10^4 células/poço, a linhagem SHSY-5Y foi semeada em placa de 96 poços na concentração de 13×10^4 células/poço. Após aderirem as células foram tratadas com os compostos Berberina (5, 10, 20 40 μ M); Tetraciclina (0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg/mL); Prednisolona (0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/mL); Omeprazol (10, 20, 40 μ M); e Levo-Tiroxina (5, 10, 20, 40 μ M) e mantidas em cultura por um período de 64h. Ao final desse período de incubação foi realizada a troca do meio de cultura por 100 μ L de meio DMEM fresco acrescidos de 10 μ L do composto MTT por poço. As células foram mantidas por mais 1h à 37°C em estufa 5% CO₂. Ao final desse período de incubação o sobrenadante era aspirado e adicionados 75 μ L de DMSO, seguido de nova incubação por 10 minutos. Após esse período as células eram direcionadas para leitura da viabilidade celular em espectrômetro usando o equipamento CLARIOstar® usando comprimento de onda de 540 nm.

3.10. Real Time PCR para verificar a modulação dos candidatos de miRNA via compostos farmacológicos em células humanas

Os ensaios de RT-PCR foram conduzidos com o intuito de verificar o aumento da quantidade de miRNA maduro nas células humanas após tratamento com os compostos candidatos. Nessa etapa sintetizamos *primers* seguindo a metodologia de *stem-loop* RT-PCR descrita por Varkonyi-Gasic e colaboradores (VARKONYI-GASIC; HELLENS, 2011) que podem ser visualizados na tabela 6 em anexo. Essa metodologia é descrita por favorecer e potencializar a amplificação de pequenas moléculas não codificantes de RNA celular. Uma vez sintetizados os primers, foram extraídas as moléculas de miRNAs dos pellets das células submetidas ao tratamento com os compostos usando kit *RNeasy MinElute Cleanup* (Cat. No. / ID: 74204) da Qiagen™. Após extração, os miRNAs foram quantificados e aproximadamente 2 μ g de amostra foram direcionados para etapa de hibridização com o primer RT. Nesta etapa as duas amostras ficaram incubando em bloco de aquecimento à 65°C por 10 minutos, seguido de 1 minuto de incubação no gelo. Após hibridização com primer RT as amostras de RNA foram para etapa de síntese do cDNA usando kit *High-Capacity cDNA Reverse Transcription* (43-688-14) da Applied Biosystems™. As amostras

resultantes da síntese do cDNA de cada condição foram então direcionadas para amplificação usando *SYBR® Green Master Mix* (1725121) da BioRad™ e o protocolo descrito pela empresa. As amostras foram quantificadas comparando-se o número de cópias entre as condições tratada e não tratada a partir da normalização com gene *housekeeping* GAPDH.

3.11. Citometria de Fluxo

Os ensaios de citometria de fluxo foram realizados utilizando citômetro Acea-NovoCyte® e software NovoExpress® para análise dos resultados. A população celular foi selecionada inicialmente em função do seu tamanho por granulosidade celular, uma vez selecionadas foram analisadas com relação a sua fluorescência utilizando filtro FITC (*fluorescein isothiocyanate*). Esse filtro consegue analisar moléculas que apresentam faixa de excitação e emissão de 495 nm/521 nm, sendo bastante utilizado na realização de análises de compostos com fluoróforo GFP. A determinação dos quadrantes nas populações celulares positivas levaram em consideração as células parentais utilizadas como controle negativo, sabendo-se que estas não apresentavam partículas de proteína GFP no interior de seu citoplasma. A quantidade de amostra adquirida pelo citômetro durante o ensaio era a necessária para contabilização de 10.000 eventos em cada condição. Os resultados foram analisados pela contabilização da intensidade de GFP em cada amostra, utilizando-se o parâmetro de medida da média aritmética X no *software* do citômetro.

3.12. Análises estatísticas

As análises estatísticas e os respectivos gráficos foram feitos utilizando-se o *software* **Graph Pad Prism 9.0**. Os resultados foram expressos em função da média de triplicatas +/- desvio padrão da média. Os grupos foram analisados com relação a sua variância através do teste *one way* ANOVA (Análise de variância) e submetidos a pós-testes de *Turkey* ou *Dunnett* dependendo do experimento analisado. Consideramos como significativa às análises estatísticas que apontaram $P < 0,05$.

4. RESULTADOS

4.1. Seleção dos candidatos de miRNA usando algoritmo PITA

O primeiro passo do nosso projeto consistiu em elencar possíveis candidatos de miRNA endógenos humanos que poderiam inativar o RNA viral. Com a colaboração do Dr. Paulo Oliveira, coordenador do programa de biologia

computacional do CNPEM, utilizamos um algoritmo denominado PITA, que permite identificar sítios alvo de miRNA em sequências gênicas. O algoritmo foi graciosamente disponibilizado pelo Dr. Eran Segal, do *Weizmann Institute for Science*, Israel. Efetuamos a análise do genoma completo do ZIKV, identificando um total de 2589 moléculas de miRNA maduro que teriam alvos na molécula de RNA viral do genoma do ZIKV. Os candidatos de miRNA foram ordenados seguindo o *score* gerado pelo algoritmo, onde os melhores candidatos apresentam um *score* mais negativo. O *score* leva em conta fatores como o número de porções complementares com o genoma de interesse, assim como a facilidade de acessos as regiões complementares através do cálculo de energia livre. Uma parte dos candidatos de miRNA podem ser observados na tabela 3 em anexo que apresenta os candidatos que obtiveram os 80 melhores *scores*.

4.2. Seleção dos candidatos de miRNA para os ensaios biológicos

Uma segunda etapa para seleção dos candidatos que seguiriam para os testes biológicos envolveu identificar candidatos que interagiam especificamente em diferentes porções do genoma viral. Nesta etapa buscamos manualmente quais candidatos que apresentavam interação completa da região *seed* do miRNA maduro (7 mer) com a quinta parte final da sequência codificante de cada proteína viral, partindo dos 100 melhores candidatos identificados pelo PITA. Foram selecionados de 2 a 3 candidatos para cada região codificante distribuída no genoma viral, e a relação dos miRNAs que seguiram para a etapa de clonagem pode ser visualizada a partir da tabela 1.

Tabela 1- Candidatos de miRNA selecionados a partir da região de interação com porções codificantes das proteínas virais

Regiões ZIKV	Candidatos de miRNA selecionados
Envelope (E)	hsa-miR-4786-3p; hsa-miR-3147; hsa-miR-7974; hsa-miR-6769b-5p; hsa-miR-320 ^a -3p
Capsídeo ©	hsa-miR-4722-5p; hsa-miR-6839-3p
Proteína prM	hsa-miR-7703; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-939-3p
NS1	hsa-miR-6855-5p; hsa-miR-6764-3p; hsa-miR-1238-5p
NS2A	hsa-miR-6783-3p; hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR-4640-5p
NS2B	hsa-miR-7110-3p; hsa-miR-4691-5p; hsa-miR-3138

NS3	hsa-miR-3180-5p; hsa-miR-6830-3p; hsa-miR-1227-3p
NS4A	hsa-miR-4776-3p; hsa-miR-8089; hsa-miR-7158-5p
NS4B	hsa-miR-6749-5p; hsa-miR-1244
NS5	hsa-miR-4763-3p; hsa-miR-1909-5p; hsa-miR-4726-3p

4.3. Construção de vetores para superexpressão dos candidatos de miRNA

Os vetores virais podem ser utilizados como ferramenta de transferência gênica. Um cassete de expressão pode ser inserido no genoma de um vírus que então é utilizado como vetor para transferir e modular a expressão do transgene. Os sistemas retrovirais são altamente seguros por terem o genoma modificado, removendo genes associados a replicação (BAJGELMAN; COSTANZI-STRAUSS; STRAUSS, 2003; STRAUSS et al., 2006). Dessa forma, nossa ideia consistiu em gerar vetores recombinantes, defectivos em replicação, contendo o miRNA de interesse na região 3' UTR do gene repórter GFP. Assim, células transduzidas GFP positivas também expressariam o miRNA candidato. O primeiro passo para a produção de vetores recombinantes foi gerar fragmentos contendo o miRNA primário. Para isso, efetuamos um trabalho manual, estudando sequências de miRNA candidatos e desenhando oligonucleotídeos para amplificar fragmentos genômicos, a partir de cultura de células humanas HEK293T. Uma vez que obtivemos os *amplicons* desejados, estes fragmentos foram clonados no plasmídeo FUGW (que codifica o genoma lentiviral recombinante), a jusante do gene repórter GFP. Os clones positivos respectivos a cada candidato de miRNA podem ser visualizados através do gel de mapa de restrição utilizando enzima EcoRI na figura 3. As bandas com peso molecular entre 200 - 350 pares de base indicam a presença do inserto contendo a sequência genica codificante dos miRNAs de interesse. Estes clones foram posteriormente sequenciados e direcionados para a etapa de produção do vetor lentiviral que foi utilizado no processo de estabelecimento das linhagens geneticamente modificadas para expressarem os miRNAs de interesse. Os candidatos hsa-miR-6839-3p; hsa-miR-6830-3p; hsa-miR-1227-3p; hsa-miR-4776-3p apresentaram problemas no processo de clonagem e não seguiram para as etapas subsequentes.

Uma vez obtidos os clones positivos relativos a cada candidato de miRNA foram realizadas as produções dos vetores lentivirais. Esse processo consiste em

transfectar o vetor plasmidial lentiviral contendo o cassete de miRNA numa linhagem empacotadora, e foi realizado pelo laboratório de vetores virais do LNBio/CNPem.

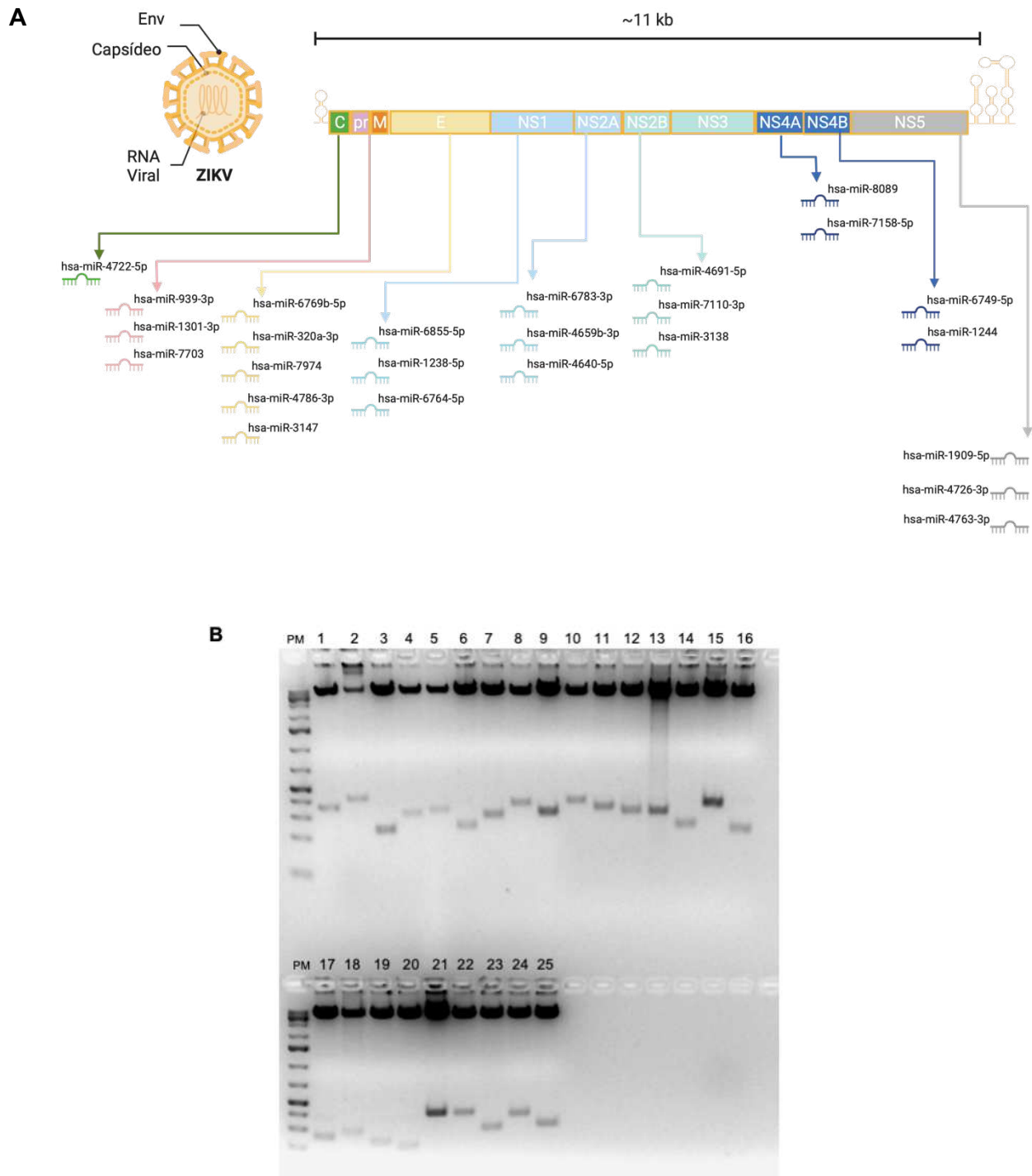


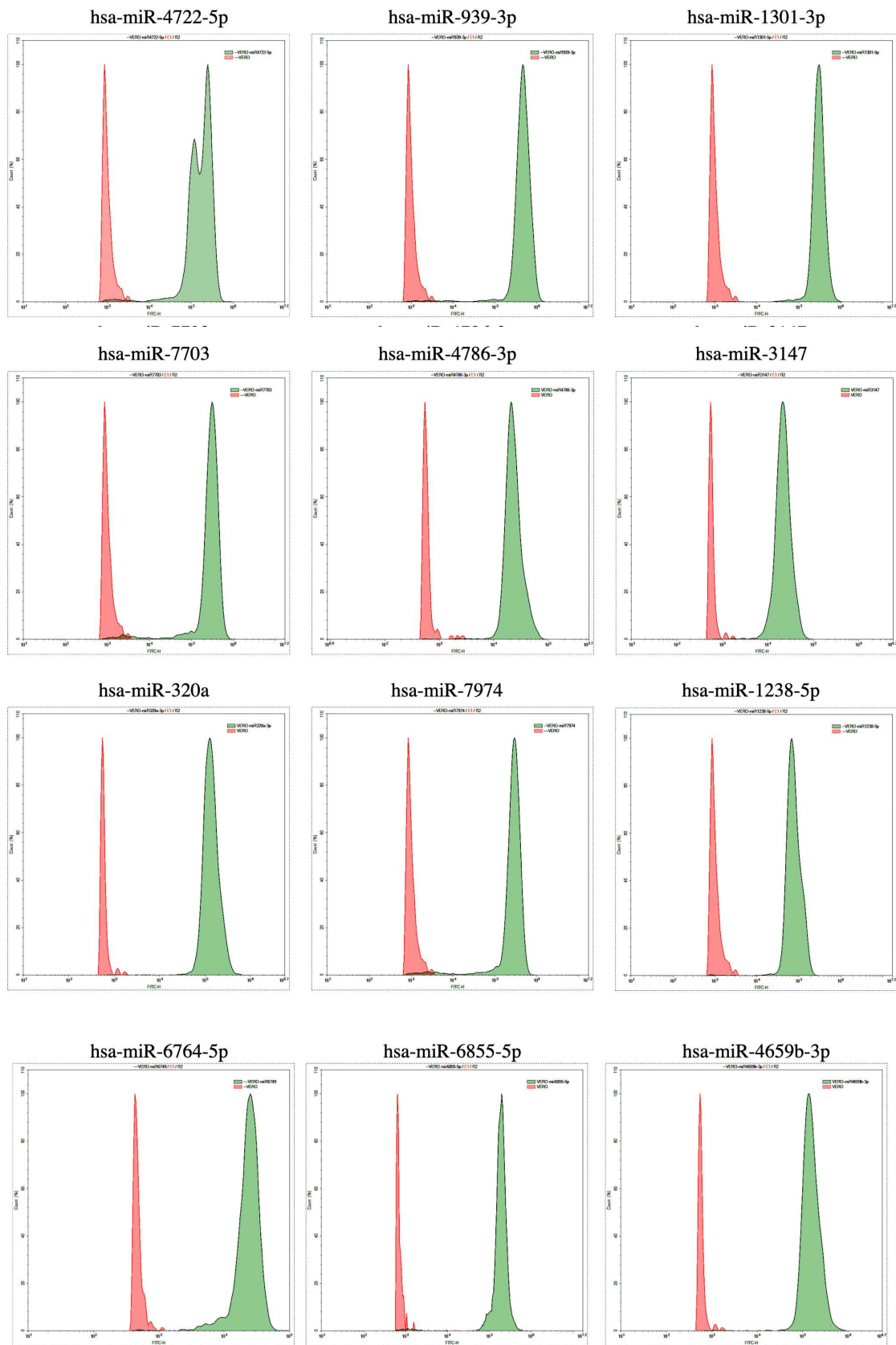
Figura 3-- Gel de agarose 2% relativo ao mapa de digestão com enzima de restrição *EcoRI* mostrando os clones positivos de cada candidato de miRNA clonado no vetor FUGW. (A) Esquema representativo dos candidatos de miRNA que foram clonados e a porção da região genômica do ZIKV onde eles apresentam interação. (B) Gel de agarose do mapa de digestão dos clones positivos. (B) Os candidatos de miRNA foram amplificados usando a técnica de PCR, cortados com a enzima de restrição *EcoRI* e ligados ao plasmídeo FUGW previamente cortado no sítio de restrição para enzima *EcoRI*. A ligação foi transformada usando bactéria competente DH5-alfa e feito o screening dos clones positivos através da digestão com a enzima utilizada na etapa da clonagem. O gel acima contém os clones positivos

onde cada número representa um candidato de miRNA. (PM) padrão molecular de 1000pb; (1) hsa-miR-4722-5p; (2) hsa-miR-939-3p; (3) hsa-miR-1301-3p ; (4) hsa-miR-7703; (5) hsa-miR-4786-3p ; (6) hsa-miR-3147; (7) hsa-miR-320a-3p; (8) hsa-miR-6769b-5p; (9) hsa-miR-7974 ; (10) hsa-miR-1238-5p ; (11) hsa-miR-6764-5p; (12) hsa-miR-6855-5p; (13) hsa-miR-4659b-3p; (14) hsa-miR-6783-3p; (15) hsa-miR-4640-5p; (16) hsa-miR-7110-3p; (17) hsa-miR-4691-5p; (18) hsa-miR-3138; (19) hsa-miR-8089; (20) hsa-miR-7158-5p; (21) hsa-miR-6749-5p; (22) hsa-miR-1244; (23) hsa-miR-1909-5p; (24) hsa-miR-4763-3p; (25) hsa-miR-4726-3p.

4.4. Estabelecimento das linhagens celulares que expressam os candidatos de miRNA.

O estabelecimento das linhagens celulares contendo os cassetes de expressão dos candidatos de miRNA foi realizada usando os vetores lentivirais produzidos na etapa anterior. Os lentivírus recombinantes foram usados para transduzir células VERO, na presença de 8 µg/ml de polibreno, e um *pool* de células miR-GFP foi gerado para cada candidato de miRNA.

Esse *pool* de células passou por um processo posterior de seleção, onde buscou-se selecionar as linhagens que apresentavam a maior expressão de GFP e consequentemente do miRNA de interesse. Isso foi possível observando o sinal de GFP de cada linhagem através da técnica de citometria de fluxo. Os gráficos representativos das citometrias de cada linhagem gerada podem ser visualizados na figura 4. Neles é possível observar a intensidade do sinal de GFP através do deslocamento do pico para direita (pico verde) em comparação com a linhagem parental (pico vermelho). Quanto maior o deslocamento, maior a intensidade do sinal de GFP observado na linhagem, e como a sequência do miRNA está codificada na região 3' do repórter GFP, a maior expressão de GFP também deve se relacionar com maior expressão das moléculas de miRNA.



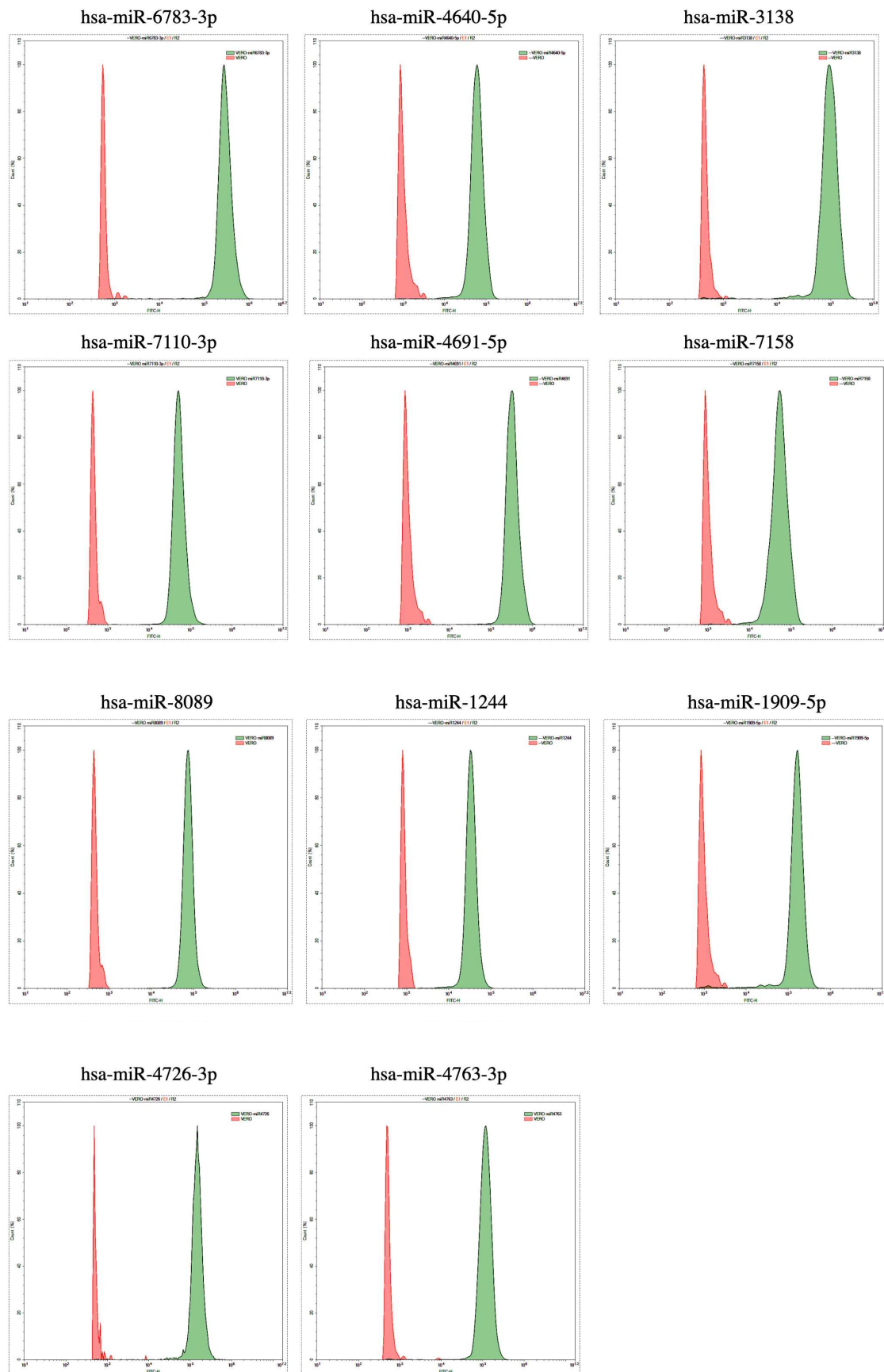


Figura 4 – Histogramas das citometrias de fluxo das linhagens geneticamente modificadas para expressar o fenótipo miR-GFP. A figura mostra os histogramas das citometrias de células

transduzidas com vetores codificando mir-GFP. Podemos observar o deslocamento do pico das células miR-GFP (verde) em comparação com o pico das células Vero parentais (vermelho) indicando a presença do gene repórter e seleção das linhagens celulares. A população celular foi selecionada inicialmente, em um primeiro gate obtido em função do seu tamanho (SSC-H) por granulosidade celular (FSC-H), uma vez selecionada a população as células foram analisadas com relação a sua fluorescência utilizando filtro FITC. Células Vero parental foram utilizadas como controle negativo para o estabelecimento dos quadrantes das células positivas.

4.5. Ensaio para avaliação do efeito antiviral mediado pelos miRNAs utilizando as linhagens VERO-miR positivas.

Conforme mencionado anteriormente, as linhagens que apresentaram a melhor expressão de GFP nas citometrias (Figura 4) foram então direcionadas ao primeiro desafio com o ZIKV. Neste ensaio buscamos avaliar uma possível ação antiviral ou citoprotetora mediada pela presença dos candidatos de miRNA nas células. Para isso, cada uma das linhagens foi semeada e infectada seguindo a metodologia de TCID₅₀ (material e métodos 3.7). A infecção viral foi analisada após um período de 6 dias, onde o experimento foi interrompido e observamos as células em microscópio óptico contabilizando o efeito citopático verificado em cada linhagem, obtido em função da infecção. O mesmo ensaio foi realizado usando uma linhagem celular parental como controle.

Como os miRNAs foram selecionados para alvos em diferentes regiões do genoma viral, ao realizarmos esse primeiro teste também procuramos por possíveis correlações entre os melhores efeitos antivirais e as regiões de interação dos miRNAs em questão, esquematizado na figura 3A.

Através desses experimentos conseguimos observar que os candidatos que apresentaram melhor potencial antiviral foram os candidatos hsa-miR-4722-5p; hsa-miR-939-3p; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-320a-3p; hsa-miR-4786-3p; hsa-miR-3147; hsa-miR-6855-5p; hsa-miR-6783-5p; hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR-7178; e hsa-miR-1909-5p que conseguiram reduzir o efeito citopático de forma significativa em mais de 50% em comparação com o controle de células parentais infectadas (Figura 5). Da mesma forma, estes mesmos candidatos conseguiram reduzir o título viral observado ao final de cada experimento, confirmando seu potencial antiviral (Figura 6).

Conforme podemos observar nas figuras 5 e 6 e relacionarmos com o esquema da figura 3A verificamos que os candidatos que possuem como alvo as regiões codificantes das proteínas C, prM, E, NS1, NS2B, NS4A, e NS5, apresentam

bons efeitos antivirais. Não observamos uma tendência específica entre interação com região genômica e melhor efeito antiviral, porém uma maior quantidade de candidatos que apresentaram efeito antiviral foi observada nas regiões E, prM e NS1 (Figura suplementar 1, em anexo).

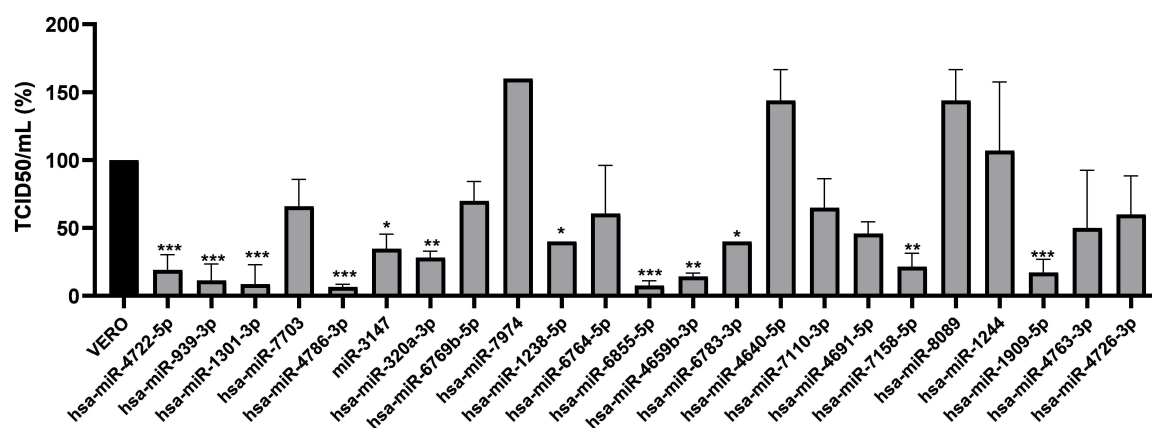


Figura 5- Expressão dos candidatos de miRNA que apresentam interação com o genoma viral do ZIKV diminuem efeito citopático em células infectadas. Linhagens celulares que superexpressam os candidatos de miRNA foram infectadas com a cepa do ZIKV utilizando uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-10} com o objetivo de verificar potencial citoprotetor dos candidatos de miRNA de interesse. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 6 dias sendo realizada observação e contagem as cegas dos poços que apresentaram efeito citopático em microscópio óptico após esse período de tempo. Os valores relativos ao efeito citopático por mL observado em cada linhagem analisada foram normalizados em função dos valores observados nas células parentais não modificadas. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. *** $P < 0,0001$ e ** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle de células parentais (Primeira coluna do gráfico). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

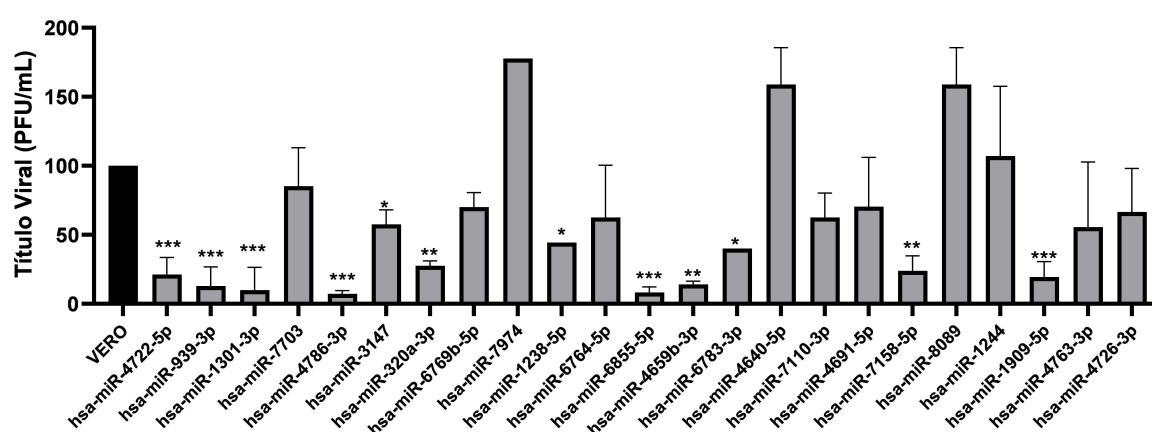


Figura 6- Expressão dos candidatos de miRNA que apresentam interação com o genoma viral do ZIKV diminuem título viral. Linhagens celulares que superexpressam os candidatos de miRNA foram infectadas com a cepa do ZIKV utilizando uma diluição seriada de 10^{-1} a 10^{-10} com o objetivo de contabilizar o título viral observado nas células que continham os candidatos de miRNA de interesse. As células foram mantidas em cultura após o período de infecção por 6 dias sendo realizada observação e contagem as cegas dos poços que apresentaram efeito citopático em microscópio óptico após esse período de tempo. Os valores relativos ao título viral observado em cada linhagem analisada foram normalizados em função dos valores observados nas células parentais não modificadas. Os

resultados são expressos em média aritmética +/- desvio padrão da média. *** $P < 0,0001$ e ** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle de células parentais (Primeira coluna do gráfico). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

4.6. Seleção de compostos candidatos com potencial modulatório de miRNA usando a plataforma METACORE.

Uma vez conhecidos quais candidatos de miRNA expressos pela célula poderiam antagonizar a infecção viral, usamos a plataforma METACORE para compreender como os miRNA endógenos poderiam ser modulados de forma a aumentar sua expressão nas células de interesse, com objetivo de proteger estas células da infecção viral. Nessa etapa do processo levamos em consideração que as sequências dos candidatos de miRNA estão presentes nas regiões gênicas não codificante de proteínas (regiões intrônicas). Assim ao favorecermos a síntese dessas proteínas isso levaria por consequência ao aumento da síntese do miRNA de interesse na célula.

O primeiro candidato analisado foi o hsa-miR-4722-5p. De acordo com as informações geradas pela plataforma METACORE ele está presente na região intrônica da sequência gênica da proteína PIEZO1 (FAM38A), no cromossomo 16.10. Esta proteína atua como um canal iônico na célula que pode ser ativado através de forças mecânicas para transmitir sinais biológicos. As moléculas que apresentam interação com ela podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 7. Nele percebemos que as moléculas KLF17, STRAT8, YY1 e Sirtuin possuem interações diretas com FAM38A sendo, portanto, as possíveis vias para se testar a modulação desse candidato de forma endógena. Uma vez tendo conhecimento sobre essas moléculas partimos para o segundo passo onde buscamos compostos químicos que poderiam ativar essas vias visando aumentar a expressão de FAM38A na célula e por consequência de hsa-miR-4722-5p. Os compostos identificados podem ser visualizados na tabela 2.

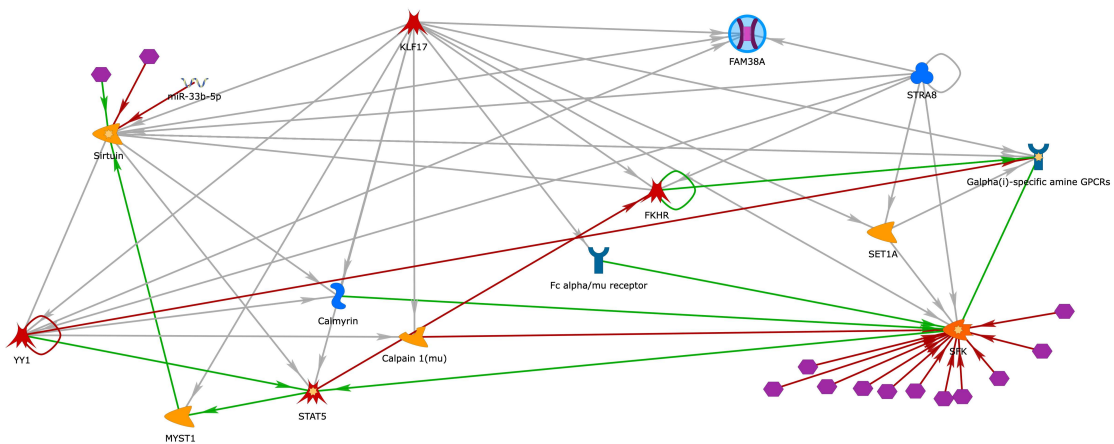


Figura 7-Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína FAM38A. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína FAM38A usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

O candidato hsa-miR-939-3p está presente na região intrônica da sequência gênica da proteína CPSF1 no cromossomo 8.11. Predições sobre essa proteína indicam sua atuação no complexo enzimático responsável pela poliadenilação e clivagem de mRNA. As moléculas que apresentam interação com ela podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 8 e tabela 2.

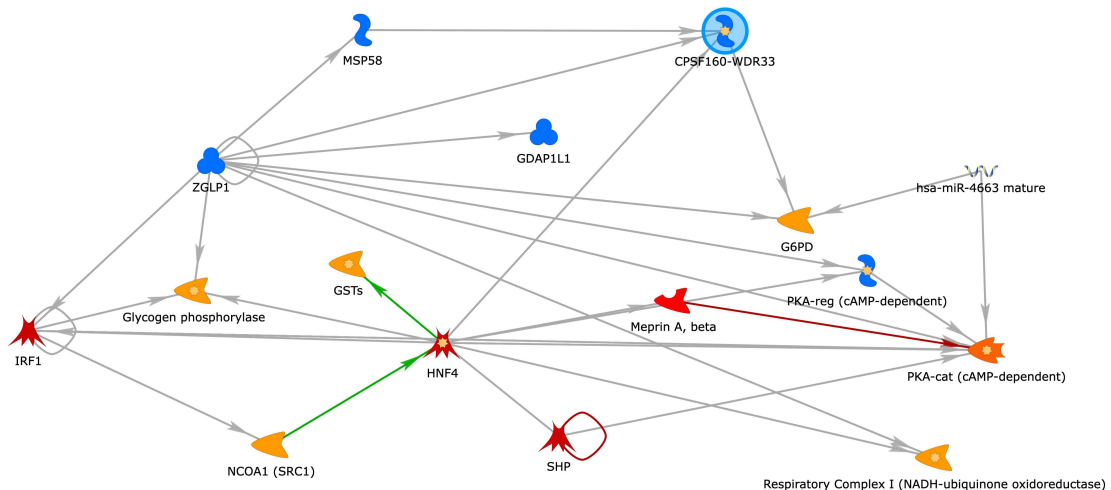


Figura 8-Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína CPSF160. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína CPSF160 usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

O candidato hsa-miR-1301-3p está presente na região intrônica da sequência gênica da proteína DNMT3A no cromossomo 2.12. Essa proteína é uma

metil-transferase que possui funcionalidade importante na etapa de desenvolvimento embrionário. As moléculas que apresentam interação com ela podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 9 e tabela 2.

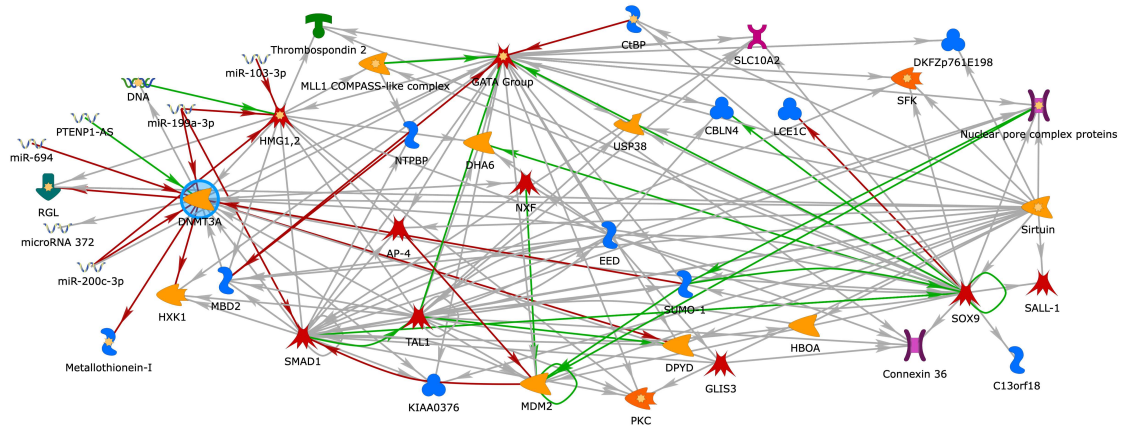


Figura 9- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína DNMT3A. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína DNMT3A usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

O candidato hsa-miR-4786-3p está presente na região intrônica da sequência gênica da proteína NDUFA10 no cromossomo 2.12. Essa proteína está vinculada com a formação do primeiro complexo enzimático responsável pela transferência de elétrons na mitocôndria. As moléculas que apresentam interação com ela podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 10 e tabela 2.

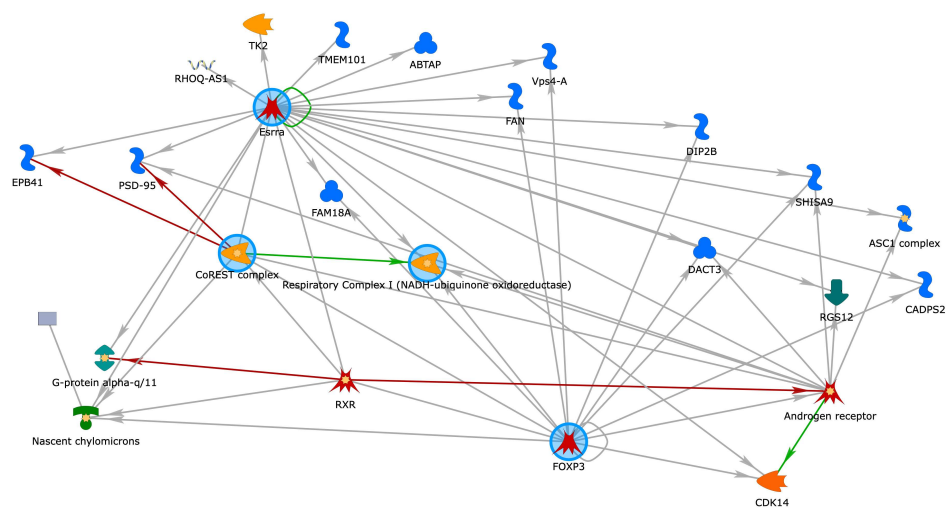


Figura 10- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína NDUFA10/NADH. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína NDUFA10/NADH usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma

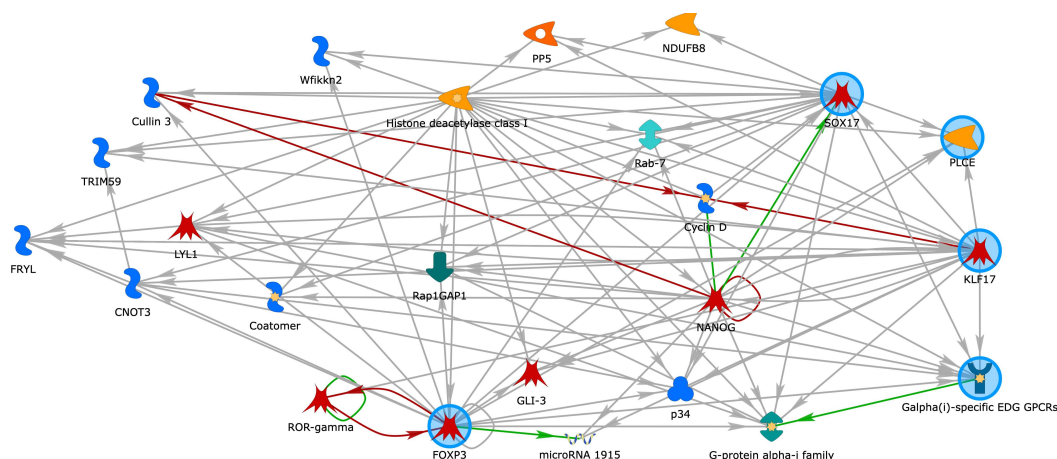


Figura 12- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína AGPAT5/PLCE. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína AGPAT5/PLCE usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

O candidato hsa-miR-6783-3p está presente na região intrônica da sequência gênica da proteína KIF18B no cromossomo 17.11. Essa proteína está envolvida nos processos de atividade motora do citoesqueleto celular. As moléculas que apresentam interação com ela podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 13 e tabela 2.

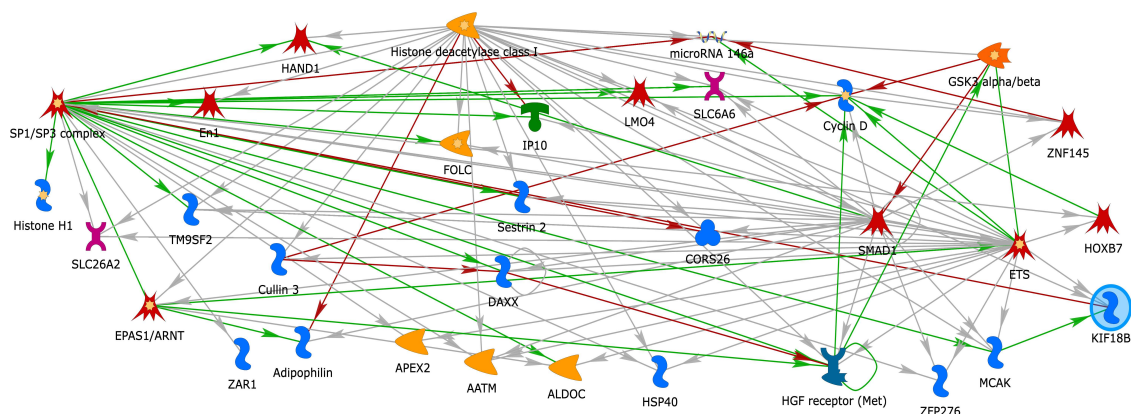


Figura 13- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína KIF18B. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína KIF18B usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

O candidato hsa-miR-7158 está presente na região genômica relacionada ao RNA longo não codificante (lncRNA) SILC1/LINC01105 no cromossomo 2.12. Estudos tem demonstrado que esse lncRNA está envolvido em processos de

neuroregeneração através da regulação da via SOX11. As moléculas que apresentam interação com ele podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 14 e tabela 2.

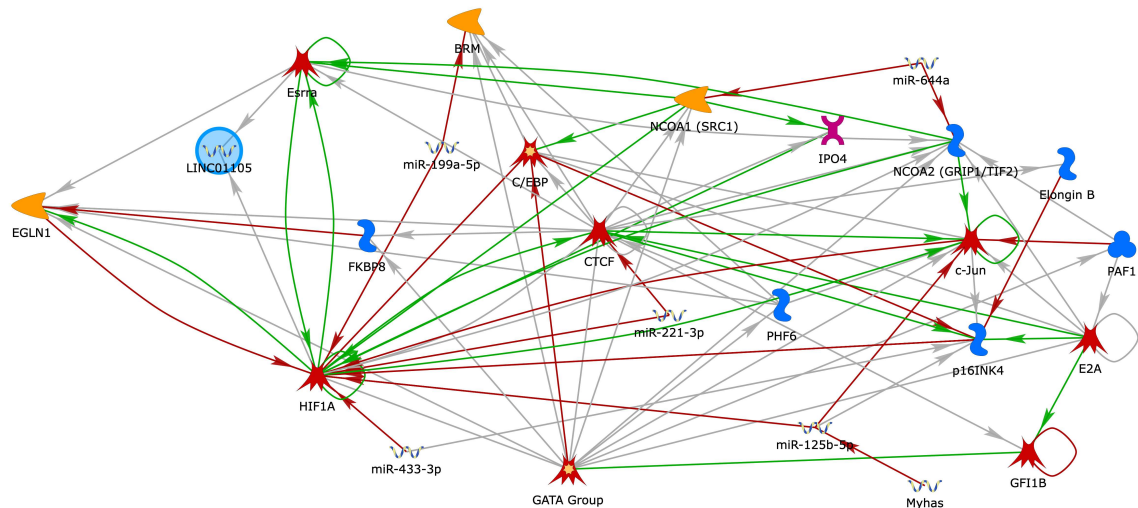


Figura 14- Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com LINC01105. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína LINC01105 usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

O candidato hsa-miR-1909-5p está presente na região intrônica da sequência gênica da proteína REXO1 no cromossomo 19.10. Essa proteína possui atividade como exonuclease, atuando na hidrólise de ligações fosfodiéster de ácidos nucleicos. As moléculas que apresentam interação com ela podem ser visualizadas através do *network* demonstrado na figura 15 e tabela 2.

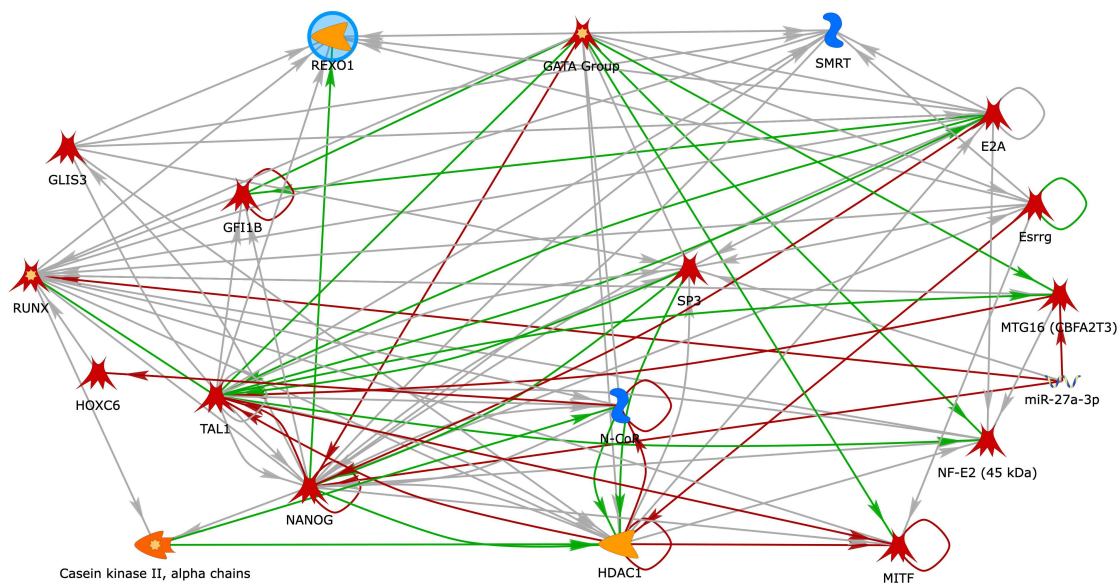


Figura 15-Network representativo das vias celulares que estão correlacionados com a proteína REXO1. Imagem representativa das interações celulares observadas ao analisarmos a proteína REXO1 usando a plataforma de dados METACORE. Cada seta representa uma forma de interação, onde setas de cor cinza representam interações com potencial estimulatório ou inibitório desconhecido, setas verdes representam interações com potencial estimulatório, e setas vermelhas representam interações com potencial inibitório.

Os candidatos hsa-miR-320a-3p e hsa-miR-3147 não estão vinculados a sequencias gênicas de nenhuma proteína e por não ser possível prever mecanismos de modulação de sua expressão na célula seguindo a metodologia explorada acima, estes candidatos foram excluídos das próximas etapas experimentais.

Tabela 2- Conjunto de dados preditos usando plataforma de bioinformática METACORE para análise das informações relativas aos candidatos de miRNA selecionados.

MIRNA	PROTEINA	VIAS	COMPOSTOS ATIVADORES	COMPOSTOS INIBIDORES
MIR-4786-3P	NDUFA10	FOXP3→NDUFA10(SHI et al., 17a)	Tgf-beta-1; IL-2; IL-10; NF-kB ; INF-gama;→FOXP3(CHEN et al., 2003; GRANT et al., 2008; MURAI et al., 2009; ZORN et al., 2006)	IL-4; IL-6; TNF-alpha→FOXP3(KATSIFIS; MOUTSOPOULOS; WAHL, 2007; VALENCIA et al., 2006; WEI et al., 2007)
		ESRRA→NDUFA10(VAN WAVEREN; MORAES, 2008)	Tetraciclina→RXRàFOXP3(Y ASUDA et al., 2008)	Colchicina; Quercetina→AHR(DVORÁK et al., 2006; ZHANG; QIN; SAFE, 2003)
		PXR/RXR-alpha→coREST complex/LSD1→NDUFA10 (DUTEIL et al., 2014; KIM et al., 2015)	Omeprazol; Berberina; Curcumina →AHR→FOXP3(CIOLINO et al., 1998; MURRAY; PERDEW, 2008; QUINTANA et al., 2008; VRZAL et al., 2005)	Quercetina→LSD1(LEE; SHIM; ZHU, 2005)
			Grupo de compostos estrógenos→ESRRA(KEIGHT LEY, 1979; MASSIE et al., 2007; RICHER et al., 2002;	

			WILKENS; CRITCHLEY, 2010)	
			Tetraciclina→complexo PXR/RXR-alpha→LSD1(DUTEIL et al., 2014; KIM et al., 2015; YASUDA et al., 2008)	
MIR-6783-3P	KIF18B	SMAD1→MCAK→KIF18B(CH OUDHURI et al., 2020a; TANENBAUM et al., 2011)	Omeprazol; Berberina; Curcumina→AHR→SMAD1 (CIOLINO et al., 1998; GANDHI et al., 2010; MURRAY; PERDEW, 2008; VRZAL et al., 2005)	Quercetina→LSD1(LEE; SHIM; ZHU, 2005)
		ETS→KIF18B(HOLLENHORS T et al., 2009)		
		MCAK→KIF18B (TANENBAUM et al., 2011)	Progesterona→NFKB1AàSMA D1(HARDY et al., 2006; KON et al., 1999)	
MIR-4659B-3P	AGPAT5/PCLE	GCRàKLF17→PCLE(BAYERL et al., 2021a; HEMMER et al., 2019a)	Grupo de compostos corticoids→GCR→KLF17(BA YERL et al., 2021a; HEIMAN et al., 1998; HEMMER et al., 2019b; OJASOO et al., 1988; ROUSSEAU; SCHMIT, 1977)	IL-4; IL-6; TNF-alpha→FOXP3 (KATSIFIS; MOUTSOPOULOS; WAHL, 2007; VALENCIA et al., 2006; WEI et al., 2007)
		FOXP3→PLCE(SHI et al., 2017b)	Grupo de compostos corticoids→GCR→SOX17(HEI MAN et al., 1998; OJASOO et al., 1988; PHUC LE et al., 2005; ROUSSEAU; SCHMIT, 1977; WHIRLEDGE et al., 2015)	
		SOX17→PLCE(WANG et al., 2018)	Tgf-beta-1; IL-2→FOXP3 (CHEN et al., 2003; GRANT et al., 2008; MURAI et al., 2009; ZORN et al., 2006)	
			Omeprazol; Berberina; curcumina→AHR→FOXP3 (CIOLINO et al., 1998; MURRAY; PERDEW, 2008; QUINTANA et al., 2008; VRZAL et al., 2005)	
			Omeprazol; Berberina; curcumina→AHR→ KLF17(CIOLINO et al., 1998; MURRAY; PERDEW, 2008; NASERI-NOSAR; NOGALSKI; SHENK, 2021a; VRZAL et al., 2005)	
			Calcitriol→c-Jun→SOX17(CHEN et al., 2021; LI et al., 2019; PÁLMER et al., 2003)	
			Estradiol→ c-Jun→SOX-17(CHEN et al., 2021; CICATIELLO et al., 1992; LI et al., 2019)	
			Progesterona→Receptor de progesterona→SOX17(KEIGH TLEY, 1979; RUBEL et al.,	

			2012; WILKENS; CRITCHLEY, 2010)	
MIR-939-3P	CPSFL	PAX6→CPSF1(CHAUDHAN et al., 2002)	Ácido retinóico→PAX6(JANG et al., 2004)	Nicotina→PAX6(WANG et al., 2011)
		AHR→ZGLP1→CPSFL1(NAG AOKA et al., 2020)	Omeprazol; Berberina; Curcumina→AHR→ZGLP1(CIOLINO et al., 1998; MURRAY; PERDEW, 2008; NASERI-NOSAR; NOGALSKI; SHENK, 2021b; VRZAL et al., 2005)	Quercetina; Colchicina →AHR (DVORÁK et al., 2006; ZHANG; QIN; SAFE, 2003)
MIR-4722-3P	PIEZO1/FAM38A	GCR→KLF17→FAM38A(BAYERL et al., 2021b; HEMMER et al., 2019a)	Grupo de compostos corticoids→GPC→KLF17 (BAYERL et al., 2021a; HEIMAN et al., 1998; HEMMER et al., 2019b; OJASOO et al., 1988; ROUSSEAU; SCHMIT, 1977)	Suramina→SIRTUIN(SCHUETZ et al., 2007)
		YY1→FAM38A(HOXHA et al., 2020)	Omeprazol; Berberina; Curcumina→AHR→KLF17 (CIOLINO et al., 1998; MURRAY; PERDEW, 2008; NASERI-NOSAR; NOGALSKI; SHENK, 2021a; VRZAL et al., 2005)	Colchicina; Quercetina →AHR (DVORÁK et al., 2006; ZHANG; QIN; SAFE, 2003)
		SIRTUIN→FAM38A(STRUB et al., 2018)	Noradrenalina →H1F1A→YY1(HUERTA-YEPEZ et al., 2006; NIKAMI; NEDERGAARD; FREDRIKSSON, 2005)	
			TNF-alpha→YY1(HUERTA-YEPEZ et al., 2006)	
			Heparina →FGF2→YY1(CHEN et al., 2007a; SANTIAGO et al., 2001)	
			Amiodarona→SIRTUIN(ZHAO et al., 2022)	
MIR-1301-3P	DNMT3A	SMAD1→DNMT3A(CHOUDHURI et al., 2020b)	Levo-tiroxina→receptor do hormônio da tireoide→SMAD1(BRENT, 1994; KYONO et al., 2016)	Sirolimus/Rapamicina →HIF1A→SMAD1(MATSUMOTO et al., 2009)
		TAL1→DNMT3A(CHIU et al., 2018a)	Omeprazol; Berberina; Curcumina →AHR→SMAD1(CIOLINO et al., 1998; GANDHI et al., 2010; MURRAY; PERDEW, 2008; VRZAL et al., 2005)	TGF-Beta→SMAD1(ZEDDOU et al., 2012)
		GLIS3→DNMT3A(KANG et al., 2017a)	Receptor de andrógeno→SMAD1(HAN et al., 2022)	GM-CSF→TAL1(CACERES-CORTES et al., 2001)
		MBD2→DNMT3A(STEFANSKA et al., 2013)	NF-κB→TAL1(TERME et al., 2008)	Colchicina; Quercetina →AHR→MBD2 (DVORÁK et al., 2006; ZHANG; QIN; SAFE, 2003)
			Grupo de compostos corticoides →GCR→GLIS3 (BAYERL et al., 2021a;	

		GATA Group→DNMT3A(KRENDL et al., 2017) Glucosamina→STAT3→GLIS3(EMILSSON et al., 2001; KIDDER; YANG; PALMER, 2008) Noradrenalina →H1F1A→MBD2 (GUO et al., 2019; HUERTA-YEPEZ et al., 2006; NIKAMI; NEDERGAARD; FREDRIKSSON, 2005) Insulina; Estradiol; Noradrenalina→c-My→MBD2(CHEN et al., 2007b; NILSEN et al., 2004; TAUB et al., 1987; WEISZ; BRESCIANI, 1988) Omeprazol; Berberina; Curcumina →AHR→MBD2(CIOLINO et al., 1998; DERE et al., 2011; MURRAY; PERDEW, 2008; VRZAL et al., 2005)	HEIMAN et al., 1998; HEMMER et al., 2019b; KANG et al., 2017b; OJASOO et al., 1988; ROUSSEAU; SCHMIT, 1977) Glucosamina→STAT3→GLIS3(EMILSSON et al., 2001; KIDDER; YANG; PALMER, 2008) Noradrenalina →H1F1A→MBD2 (GUO et al., 2019; HUERTA-YEPEZ et al., 2006; NIKAMI; NEDERGAARD; FREDRIKSSON, 2005) Insulina; Estradiol; Noradrenalina→c-My→MBD2(CHEN et al., 2007b; NILSEN et al., 2004; TAUB et al., 1987; WEISZ; BRESCIANI, 1988) Omeprazol; Berberina; Curcumina →AHR→MBD2(CIOLINO et al., 1998; DERE et al., 2011; MURRAY; PERDEW, 2008; VRZAL et al., 2005)	
MIR-1909-5P	REXO1	ESRRG→REXO1(VERNIER et al., 2020a) GLIS3→REXO1(KANG et al., 2017b) NANOG→REXO1(HEURTIER et al., 2019) GATA GroupàREXO1(CHIU et al., 2018b; CHOUDHURI et al., 2020c) Tal1→REXO1(CHIU et al., 2018b) E2A→REXO1(HEMMER et al., 2019b) RUNX→REXO1(DEBAIZE et al., 2018)	IL-6→ESRRG(SON et al., 2017) IL-8; IL-6; IL-4; TGF-Beta; Fibronectina; Leptina→NANOG(AVTANSKI et al., 2015; HUNT; SINGH; SCHWARZBAUER, 2012; OHANNA et al., 2013; ŚWIERCZEK-LASEK et al., 2019; TANG et al., 2018; XU et al., 2008) Grupo de compostos corticoides →GCRàGLIS3 (BAYERL et al., 2021a; HEIMAN et al., 1998; HEMMER et al., 2019b; KANG et al., 2017b; OJASOO et al., 1988; ROUSSEAU; SCHMIT, 1977) Glucosamina→STAT3→GLIS3(EMILSSON et al., 2001; KIDDER; YANG; PALMER, 2008) NF-κB→TAL1 (TERME et al., 2008) Noradrenalina; Levo-tri-iodotironina →H1F1A→E2A(BHATTACHARYA et al., 2007; MOELLER et al., 2005; NIKAMI; NEDERGAARD; FREDRIKSSON, 2005)	Nicotina →Pax6→NANOG (WANG et al., 2011; ZHANG et al., 2010) Colchicina; Quercetina →AHR→NANOG(DVORÁK et al., 2006; ZHANG; QIN; SAFE, 2003; ZHAO et al., 2012) Colchicina; Quercetina →AHR→GLIS3(DVORÁK et al., 2006; KIDDER; YANG; PALMER, 2008; ZHANG; QIN; SAFE, 2003) GM-CFS→TAL1 (CACERES-CORTES et al., 2001) Sirolimus/Rapamicina→HIF1A (MATSUMOTO et al., 2009)

			TNF-alpha →E2A(BHATTACHARYA et al., 2007)	
			Insulina; Calcitriol→RUNX(FOWLKES et al., 2008; VIERECK et al., 2002)	
			Insulina→RUNX→NANOG(FO WLKES et al., 2008; LI; GE; FRANCESCHI, 2021)	
MIR-7158	Linco1105	HIF1A→LIN(YE et al., 2019)	Noradrenalina; Levo-tri-iodotironina →H1F1A→LIN (MOELLER et al., 2005; NIKAMI; NEDERGAARD; FREDRIKSSON, 2005)	Sirolimus/Rapamicina→HIF1A(M ATSUMOTO et al., 2009)
		ESRRA→LIN(VERNIER et al., 2020b)	Grupo de compostos estrógenos →ESRRA (KEIGHTLEY, 1979; MASSIE et al., 2007; RICHER et al., 2002; WILKENS; CRITCHLEY, 2010)	
MIR-6855	USP20	ANDROGENO RECEPTOR→USP20(LIN et al., 2009)	Prulifloxacina; Noretindrona ; Fludrocortisona; Cortisona →Receptor de andrógeno(AFRICANDER; STORBECK; HAPGOOD, 2014; LYNCH et al., 2017; MATIAS et al., 2002)	NF-kB→E2F1(NEUMAN et al., 1995)
		E2F1→USP20(NISHIYAMA et al., 2009)	Acido retinóico →TBX2→E2F1(BOSKOVIC; NILES, 2004; LU et al., 2021)	Colchicina; Quercetina →AHR→E2F1(DVORÁK et al., 2006; MARLOWE et al., 2008; ZHANG; QIN; SAFE, 2003)
			Prolactina→E2F1(HOSOKAW A et al., 1995)	

4.7. Ensaio para avaliação do efeito antiviral mediado pelos miRNAs endógenos induzidos por compostos candidatos.

A próxima etapa consistiu na prova de conceito da hipótese de que esses miRNAs poderiam ser modulados de forma endógena ao ativarmos vias que influenciariam na expressão das moléculas em que as sequências gênicas dos miRNAs estariam inseridas.

Ao analisarmos os dados obtidos pela plataforma METACORE e resumidos na tabela 2 levamos em consideração que compostos que conseguissem estimular mais de um candidato de miRNA seriam preferencialmente selecionados, entendendo que poderiam levar a um melhor efeito antiviral final. Além desse perfil de seleção, optamos por compostos que ativariam vias que não tivessem muitas interações com outras moléculas, tentando dessa forma minimizar efeitos adversos que poderiam

alterar o padrão de homeostase celular durante o tratamento. E por último, optamos por testar compostos acessíveis a população e que já teriam aprovação por órgãos reguladores, visando uma reproposição de uso farmacológico.

Dessa forma Berberina, Tetraciclina, Prednisolona, Omeprazol e Levotiroxina foram selecionados para os testes iniciais de modulação dos candidatos de miRNA em análise.

O esquema experimental consistiu em infectar as linhagens de células humanas MCF-7, SHSY-5Y, HT1080, A549 e HUH-7 com o ZIKV usando MOI de 5, tratar as linhagens com diferentes concentrações dos fármacos e verificar o efeito inibitório na infecção viral, através da coleta dos sobrenadantes das células infectadas após o período estabelecido e posterior titulação desses sobrenadantes em células VERO.

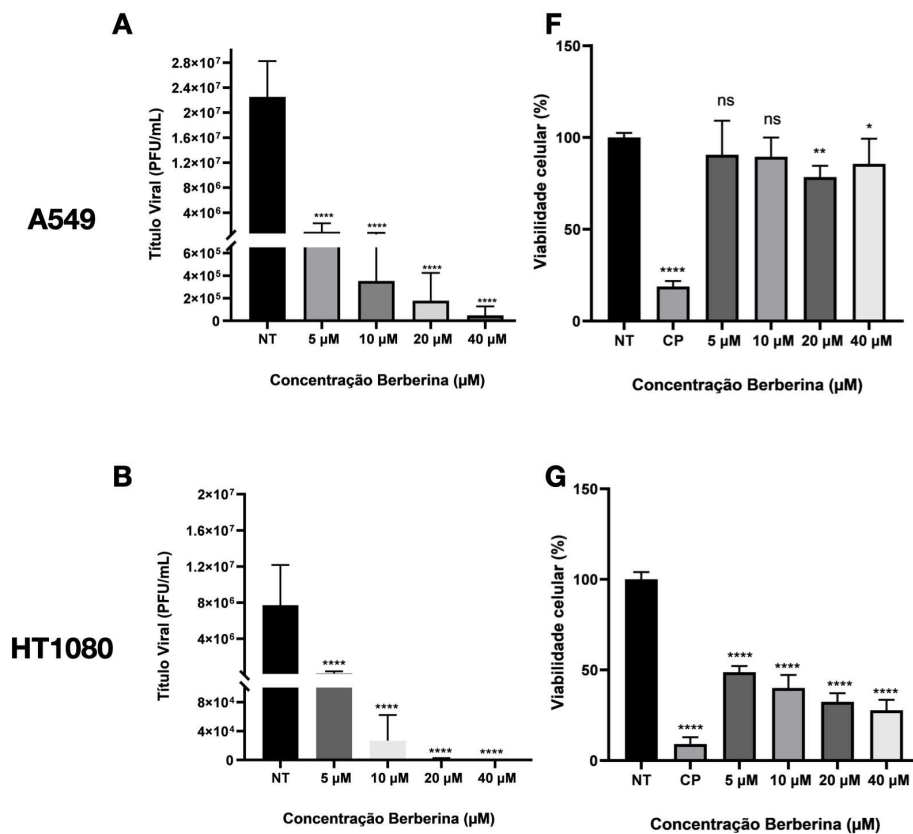
-Avaliação do efeito modulatório do composto Berberina

O composto Berberina apresentou um bom perfil de inibição viral para o ZIKV, assim como um padrão de citotoxicidade baixo para a maioria das células tratadas. Podemos observar através da figura 16 que o composto conseguiu reduzir de forma significativa o título viral em todas as concentrações testadas (5, 10, 20, e 40 μ M) para as células A549, HUH7, MCF-7, e SHSY-5Y.

O tratamento com o composto Berberina conseguiu reduzir em até 100% o título viral nas células MCF-7 nas concentrações 10, 20 e 40 μ M, indicando um potencial antiviral relevante nas condições apresentadas (Figura 16D). A ligeira diminuição da viabilidade celular (20 a 30%) apresentada nas mesmas concentrações de tratamento para esta linhagem celular estariam relacionadas com alterações no crescimento celular e não diretamente envolvidas na citotoxicidade por morte celular, esse perfil foi observado ao analisarmos as células em microscópio óptico ao final das 64h de tratamento e não observarmos alterações no fenótipo celular (Figura 16I). A linhagem MCF-7 apresenta um perfil de crescimento celular acelerado em comparação com as outras linhagens analisadas e por esse motivo entendemos que o perfil de crescimento foi alterado de uma forma mais evidente no modelo de estudo escolhido.

Embora o tratamento com o composto tenha resultado em uma diminuição significativa do título viral para as células HT1080 (Figura 16 B), entendemos ao analisar o perfil de citotoxicidade deste composto nesta linhagem que esta diminuição do título viral teria uma correlação com a diminuição do número de células que foram infectadas ao longo do experimento, devido ao perfil citotóxico (Figura 16G), ao invés de uma possível relação com seu potencial antiviral.

De acordo com os dados apresentados na tabela 2, o composto Berberina apresenta interação com a via AHR, podendo modular sua ativação e estimular o aumento da transcrição das moléculas NDUFA10; KIF18B; PCLE; CPSFL; FAM38A e DNMT3A, e por consequência dos respectivos miRNAs hsa-miR-4786-3p; hsa-miR-6783-5p; hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR-939-3p; hsa-miR-4722-3p; hsa-miR-1301-3p.



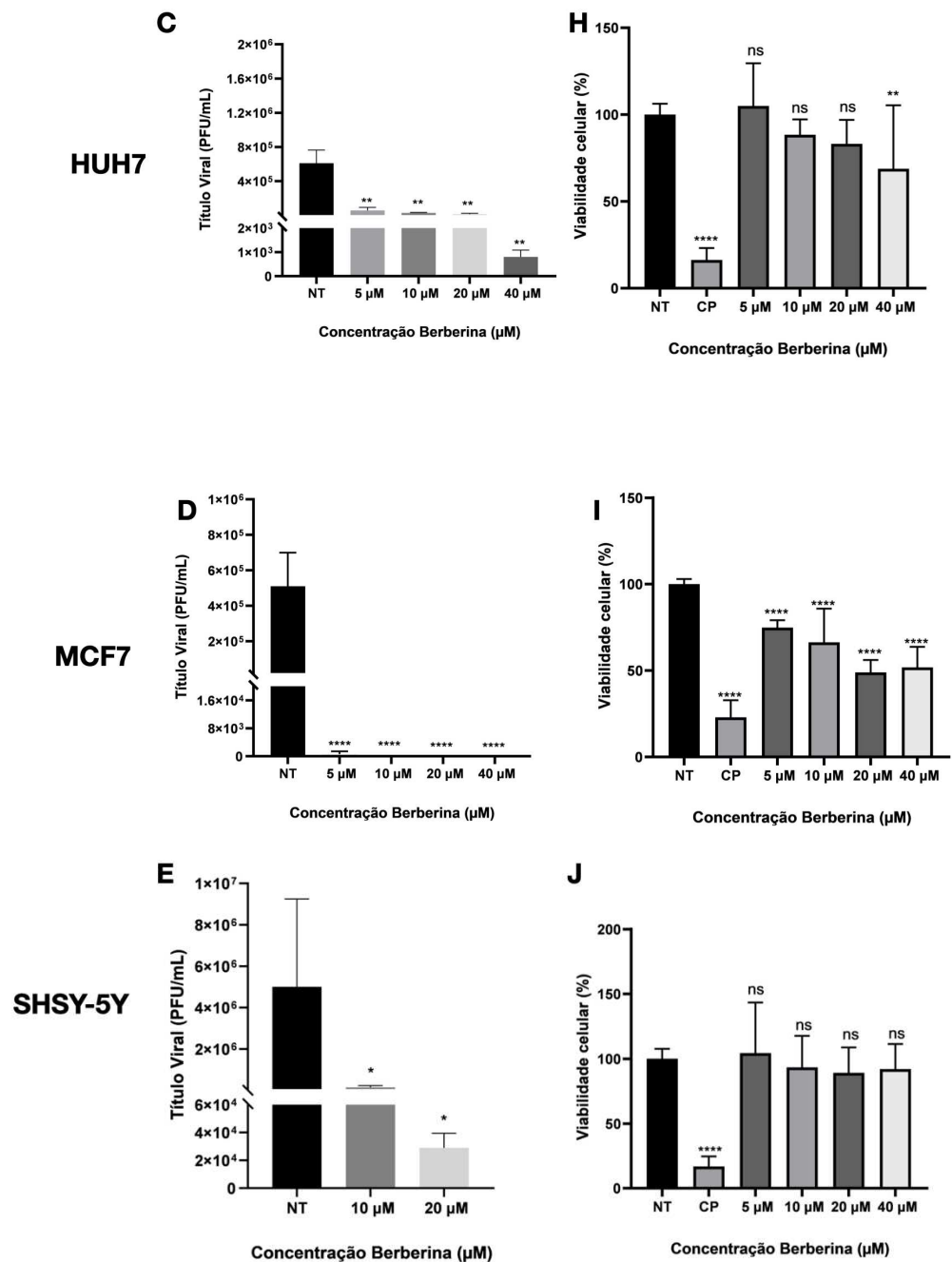


Figura 16-Ensaio in vitro para verificar inibição da infecção viral em cultura de células tratadas com Berberina. (A-E) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7; SHSY-5Y) foram tratadas com composto Berberina nas concentrações 5; 10; 20; 40 μM por um período de 16h, infectadas com ZIKV MOI 5 e mantidas em cultura e tratamento por 48hpi. Ao final das 48hpi o sobrenadante foi coletado e encaminhado para o experimento de titulação em células VERO. NT representa o grupo relativo aos experimentos dos sobrenadantes coletados das células infectadas e não tratadas. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). (F-J) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7; SHSY-5Y) foram tratadas com composto Berberina nas concentrações 5; 10; 20; 40 μM por um período 64h, tratadas com MTT por 1h e analisadas em função da viabilidade celular através de leitura no espectrômetro. NT representa o grupo das células não tratadas e CP ao controle positivo. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio

padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

-Avaliação do efeito modulatório do composto Tetraciclina

O tratamento com o composto Tetraciclina também apresentou um perfil de citotoxicidade baixo para a maioria das células tratadas e um bom perfil de inibição para o ZIKV. Através da figura 17 foi possível verificar que o composto conseguiu reduzir de forma significativa o título viral em pelo menos uma da faixa de concentrações testadas (0,05; 0,1; 0,15; 0,20 mg/mL) para as células A549, HUH-7, MCF-7, e SHSY-5Y.

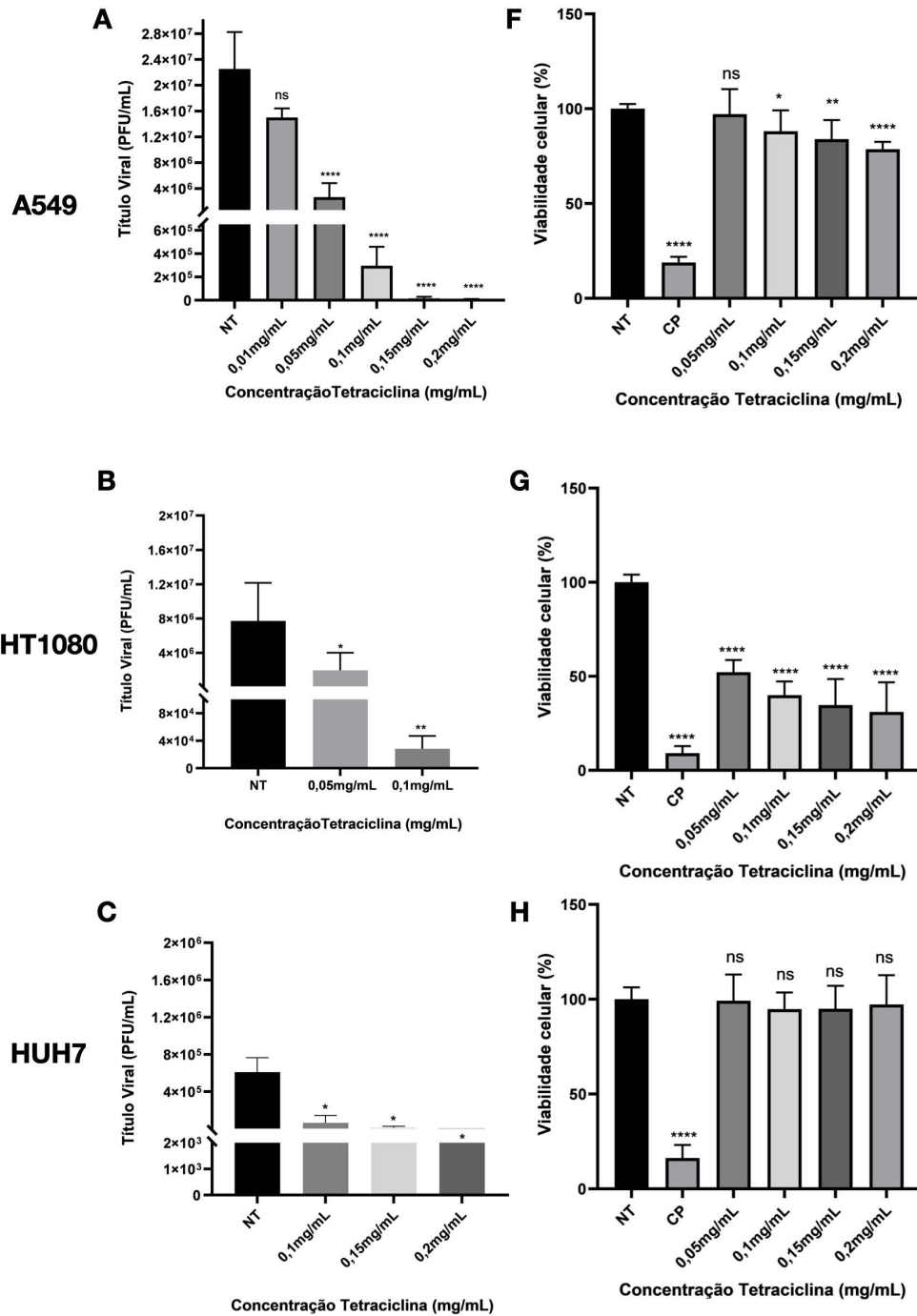
Para este tratamento as células A549 apresentaram um melhor perfil de inibição viral conseguindo reduzir em cerca de 1 log o título viral já na concentração de 0,05 mg/mL e em até 3 logs no tratamento com as concentrações de 0,15 e 0,2 mg/mL (Figura 17A). As alterações de viabilidade celular observadas para as mesmas concentrações modulatórias testadas foram baixas (de 10 a 20%) (Figura 17F).

As linhagens HUH-7 e SHSY-5Y (Figura 17C e 17E) apresentaram redução de aproximadamente 1 log no título viral nas concentrações de tratamento testadas. A linhagem HUH-7 não apresentou alterações de viabilidade significativas em razão dos tratamentos analisados (Figura 17H) e a linhagem SHSY-5Y apenas apresentou citotoxicidade no tratamento com 0,2mg/mL (Figura 17J).

A linhagem MCF-7 apresentou redução de 2 logs no título viral das células tratadas com as maiores concentrações (Figura 17D) e ligeira alteração na viabilidade celular (Figura 17I), que assim como foi observado após o tratamento com o composto Berberina na análise anterior, estariam correlacionadas com alterações no crescimento celular e não diretamente envolvidas na citotoxicidade por morte celular.

Assim como observado nos testes realizados com o composto Berberina a linhagem HT1080 mostrou um perfil de citotoxicidade alto após o tratamento com Tetraciclina na faixa de concentrações utilizada (Figura 17G). Desta forma desconsideramos as alterações significativas observadas no título viral das células tratadas (Figura 17B), entendendo que elas não indicariam um efeito da modulação dos miRNAs após tratamento das células com Tetraciclina, mas sim uma consequência da morte celular observada em função do tratamento.

Segundo os dados coletados usando o METACORE, o tratamento com Tetraciclina seguiria o caminho de ativação do complexo PXR/RXR- α , seguido de ativação de LSD1 e NDUFA10 na modulação de hsa-miR-4786-3p (Tabela 2).



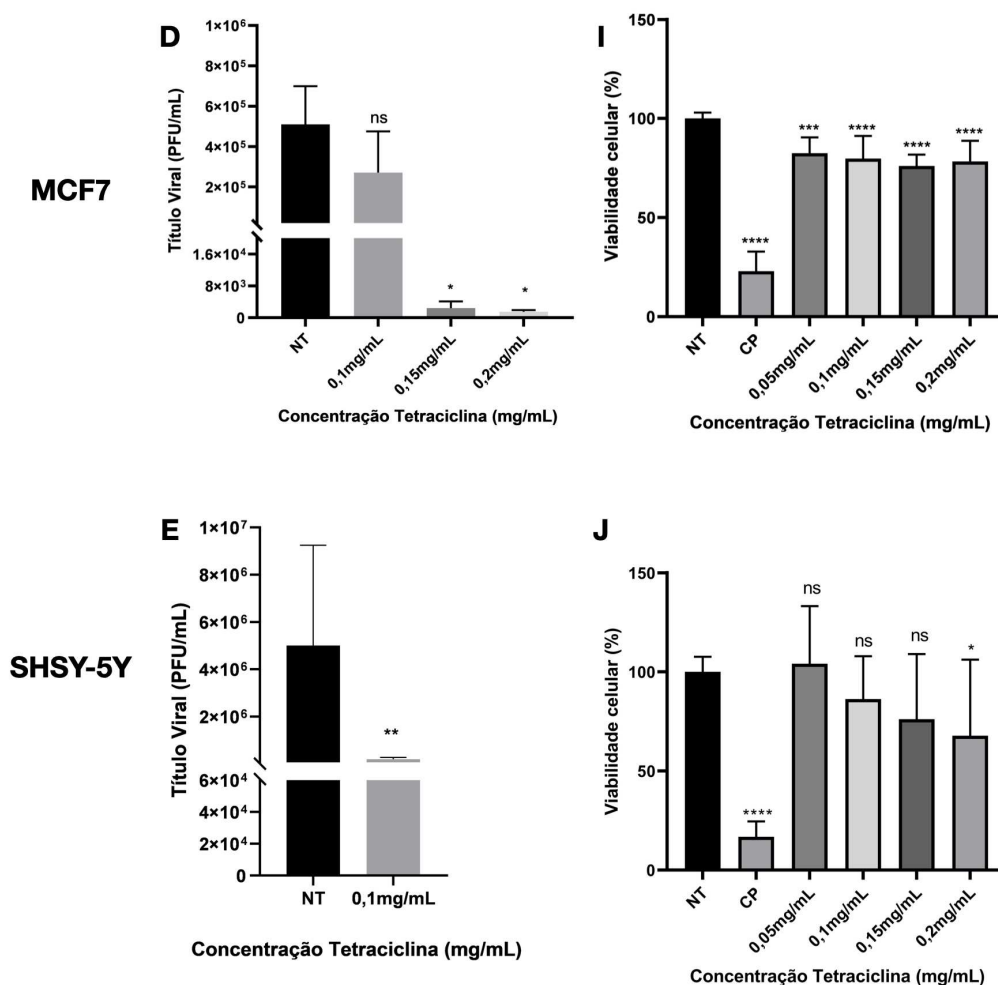


Figura 16- Ensaio in vitro para verificar inibição da infecção viral em cultura de células tratadas com Tetraciclina. (A-E) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7; SHSY-5Y) foram tratadas com composto Tetraciclina nas concentrações 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg/mL por um período de 16h, infectadas com ZIKV MOI 5 e mantidas em cultura e tratamento por 48hpi. Ao final das 48hpi o sobrenadante foi coletado e encaminhado para o experimento de titulação em células VERO. NT representa o grupo relativo aos experimentos dos sobrenadantes coletados das células infectadas e não tratadas. Os resultados são expressos em média aritmética +/- desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). (F-J) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7; SHSY-5Y) foram tratadas com composto Tetraciclina nas concentrações 0,05; 0,1; 0,15; 0,2 mg/mL por um período 64h, tratadas com MTT por 1h e analisadas em função da viabilidade celular através de leitura no espectrômetro. NT representa o grupo das células não tratadas e CP ao controle positivo. Os resultados são expressos em média aritmética +/- desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

-Avaliação do efeito modulatório do composto Prednisolona

O tratamento com o composto Prednisolona apresentou um perfil de inibição viral significativo para as linhagens celulares pulmonares.

Podemos observar através da figura 18B que o tratamento com o composto Prednisolona reduziu de forma significativa em aproximadamente 1 log o título viral

observado nas células HT1080 na menor concentração testada (0,5mg/mL) e em até 2 logs na maior concentração em que não foi observado efeito citotóxico (1mg/mL) (Figura 18F).

A segunda linhagem celular pulmonar testada A549, também apresentou um perfil de redução do título viral significativo após o tratamento com Prednisolona, porém os melhores resultados foram verificados usando uma faixa de concentrações mais alta (1,5 mg/mL – 2,5 mg/mL) indicando uma sensibilidade inferior a modulação via tratamento com o composto em comparação com as células HT1080 (Figura 18A). Em contrapartida a viabilidade celular apenas apresentou diferença significativa no tratamento com 2,5 mg/mL do composto, indicando que apesar da célula precisar de concentrações maiores do composto para atingir reduções do título viral expressivas, a mesma linhagem se mostrou mais maleável ao tratamento, não apresentando citotoxicidade na mesma faixa de tratamento que as outras linhagens analisadas (Figura 18E).

As linhagens HUH-7 e MCF-7 apresentaram redução do título viral de forma significativa, porém branda, nas concentrações analisadas que apresentaram baixo efeito citotóxico ao tratamento com o composto Prednisolona (Figuras 18C, 18D, 18G, 18H).

De acordo com a tabela 2 o tratamento com o composto Prednisolona estaria correlacionado com ativação do grupo GCR, seguido de interação com molécula KLF17 e consequente modulação de PCLE, e/ou FAM38A. Uma segunda possibilidade seria ativação do grupo GCR, seguido de interação com GLIS3 e modulação de DNMT3A e REXO1. O estímulo sobre a transcrição dessas moléculas modularia os candidatos hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR-4722-3p; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-1909-5p.

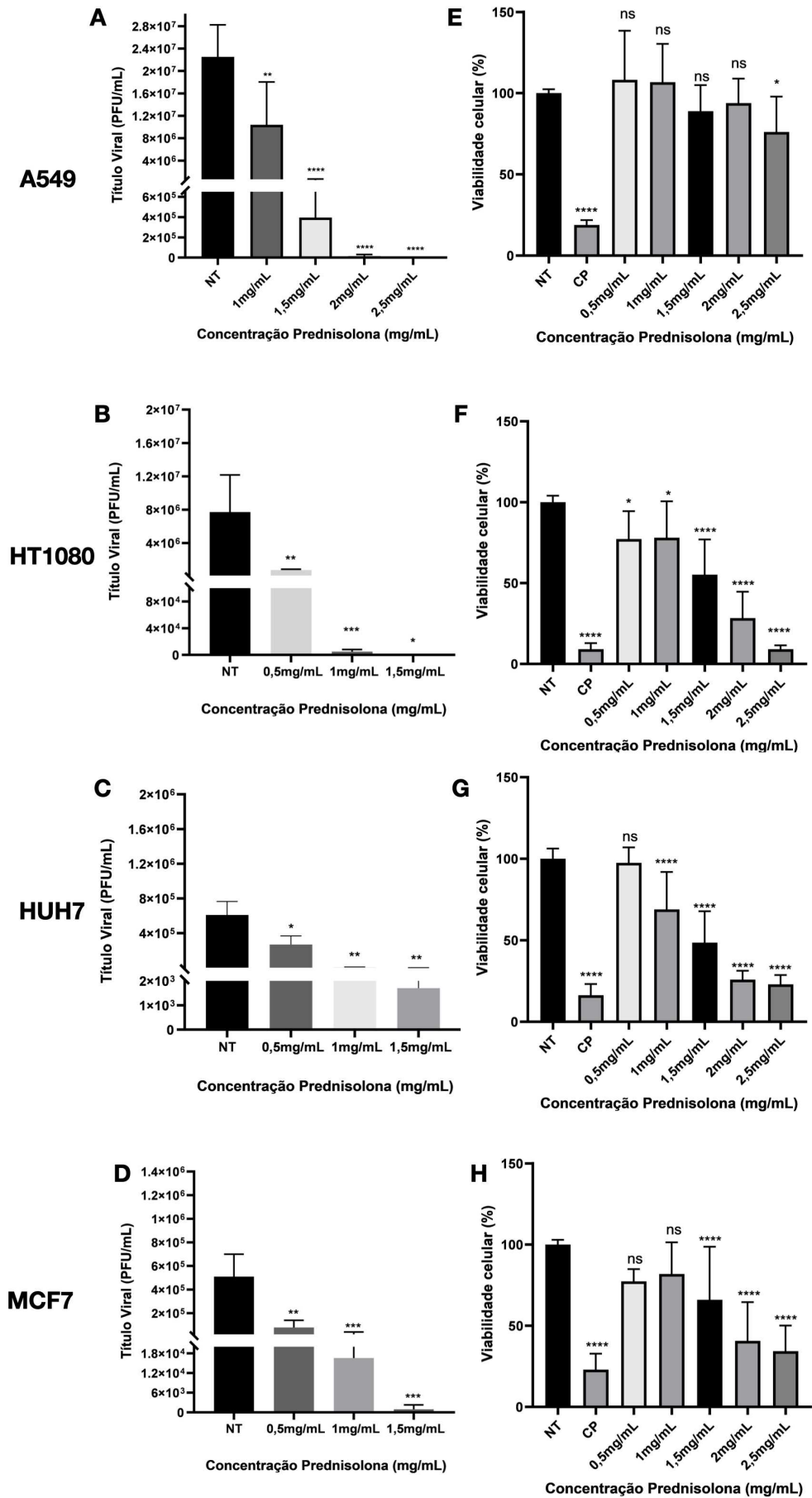
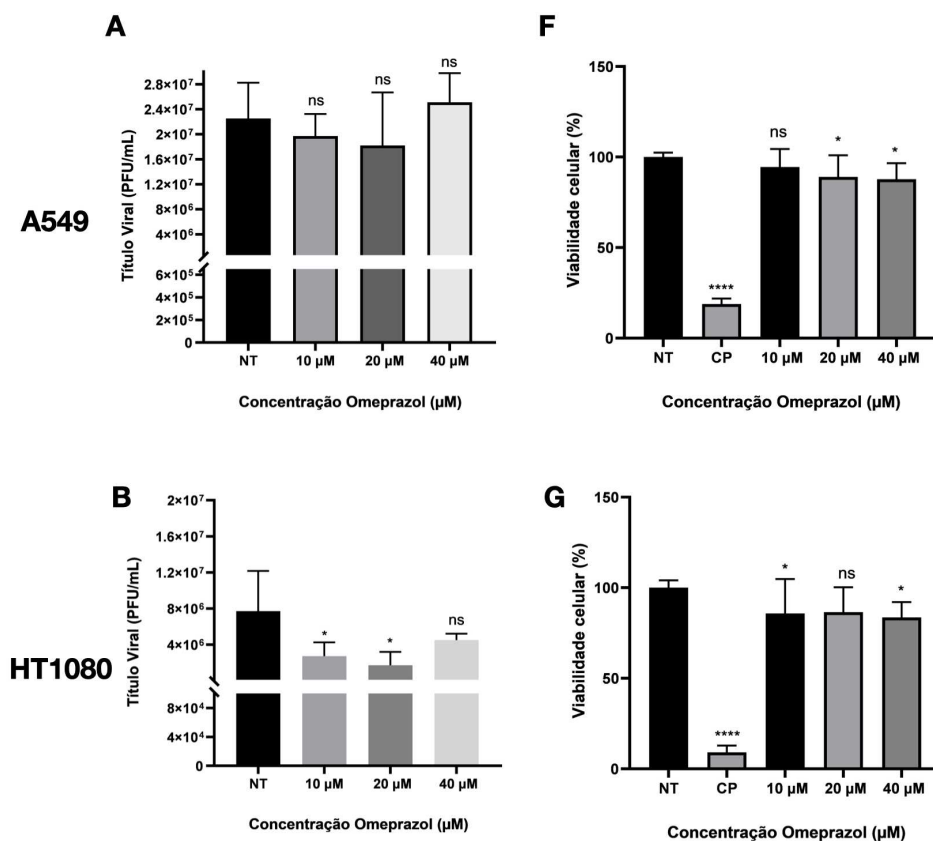


Figura 17- Ensaio *in vitro* para verificar inibição da infecção viral em cultura de células tratadas com Prednisolona. (A-D) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7) foram tratadas com composto Prednisolona nas concentrações 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5 mg/mL por um período de 16h, infectadas com o ZIKV MOI 5 e mantidas em cultura e tratamento por 48hpi. Ao final das 48hpi o sobrenadante foi coletado e encaminhado para o experimento de titulação em células VERO. NT representa o grupo relativo aos experimentos dos sobrenadantes coletados das células infectadas e não tratadas. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). (E-H) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7) foram tratadas com composto Prednisolona nas concentrações 0,5; 1; 1,5; 2; 2,5mg/mL por um período 64h, tratadas com MTT por 1h e analisadas em função da viabilidade celular através de leitura no espectrômetro. NT representa o grupo das células não tratadas e CP ao controle positivo. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

-Avaliação do efeito modulatório do composto Omeprazol

O tratamento com o composto Omeprazol apresentou um baixo potencial inibitório para as linhagens celulares analisadas.

Podemos observar através da figura 19 que o tratamento com o composto reduziu de forma significativa, porém pouco expressiva o título viral apenas nas linhagens SHSY-5Y e HT1080. Ainda o tratamento com o composto não apresentou efeito citotóxico pronunciado em nenhuma das linhagens analisadas dentro da faixa de concentrações testadas.



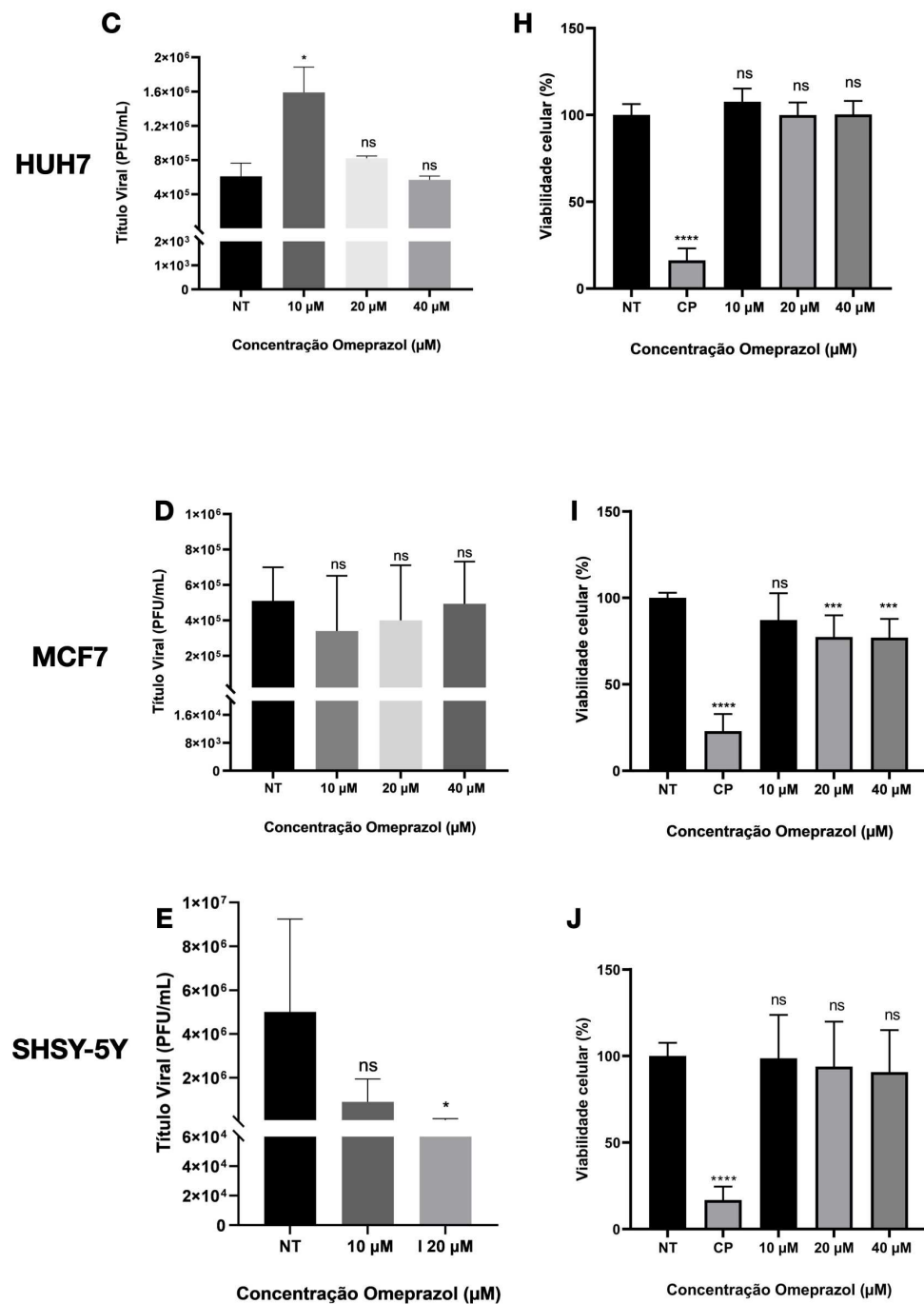


Figura 18- Tratamento com composto Omeprazol em linhagens celulares humanas não apresentam diminuição expressiva do título viral via modulação de candidatos de miRNA. (A-E) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7; SHSY-5Y) foram tratadas com composto Omeprazol nas concentrações 10, 20, 40 μM por um período de 16h, infectadas com ZIKV MOI 5 e mantidas em cultura e tratamento por 48hpi. Ao final das 48hpi o sobrenadante foi coletado e encaminhado para o experimento de titulação em células VERO. NT representa o grupo relativo ao experimento dos sobrenadantes coletados das células infectadas e não tratadas. Os resultados são expressos em média aritmética +/- desviopadrão da média. **** P<0,0001 e *** P< 0,001 relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). (F-J) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7; SHSY-5Y) foram tratadas com composto Omeprazol nas concentrações 10, 20, 40 μM por um período 64h, tratadas com MTT por 1h e analisadas em função da viabilidade celular através de leitura no espectrômetro. NT representa o grupo das células não tratadas e CP ao controle positivo. Os resultados são expressos em média aritmética +/- desvio padrão da média. **** P<0,0001 e *** P<

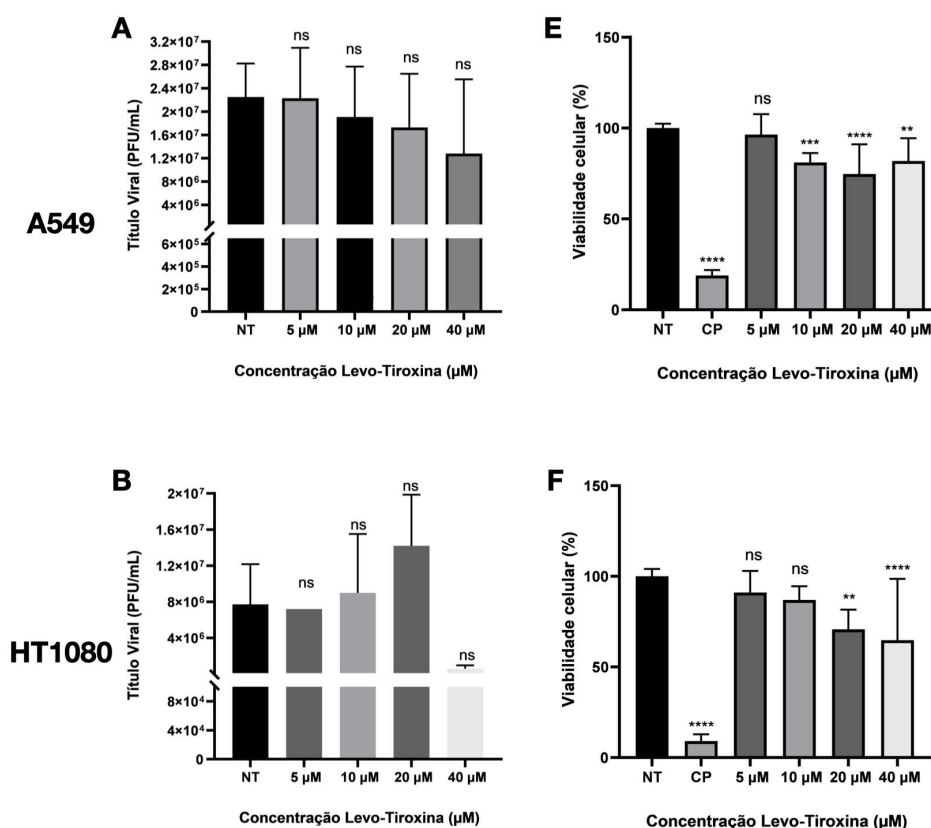
0,001 relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

-Avaliação do efeito modulatório do composto Levo-Tiroxina

O tratamento com o composto Levo-Tiroxina apresentou um perfil de inibição viral baixo para as linhagens celulares analisadas.

Podemos observar através da figura 20 que o tratamento com o composto reduziu de forma significativa o título viral na linhagem MCF-7, porém não apresentou efeito nas linhagens A549, HT1080 e HUH-7. Os gráficos da figura 20 de F a J demonstram uma ligeira citotoxicidade associada ao composto na maior concentração testada.

O tratamento de MCF7 (Figura 20B) levou a redução do título em aproximadamente um Log na concentração de 40 μ M.



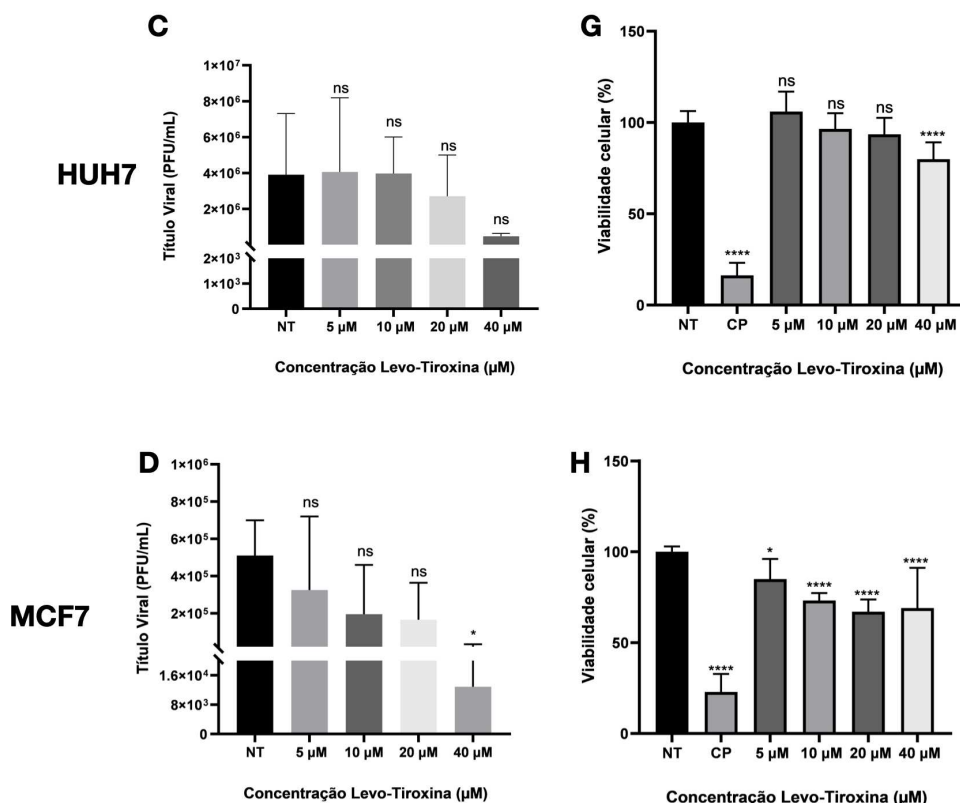


Figura 19- Tratamento com composto Levo-Tiroxina em linhagens celulares humanas apresentam singela diminuição do título viral via modulação de candidatos de miRNA. (A-D) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7) foram tratadas com composto Levo-Tiroxina nas concentrações 5, 10, 20, 40 μM por um período de 16h, infectadas com ZIKV MOI 5 e mantidas em cultura e tratamento por 48hpi. Ao final das 48hpi o sobrenadante foi coletado e encaminhado para o experimento de titulação em células VERO. NT representa o grupo relativo ao experimento dos sobrenadantes coletados das células infectadas e não tratadas. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). (E-H) Linhagens celulares humanas (A549; HT1080; HUH7; MCF7) foram tratadas com composto Levo-Tiroxina nas concentrações 5, 10, 20, 40 μM por um período 64h, tratadas com MTT por 1h e analisadas em função da viabilidade celular através de leitura no espectrômetro. NT representa o grupo das células não tratadas e CP ao controle positivo. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. **** $P < 0,0001$ e *** $P < 0,001$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta). Gráficos representativos de 3 experimentos independentes.

4.8. Explorando a correlação da modulação farmacológica de miRNAs endógenos e efeito antiviral

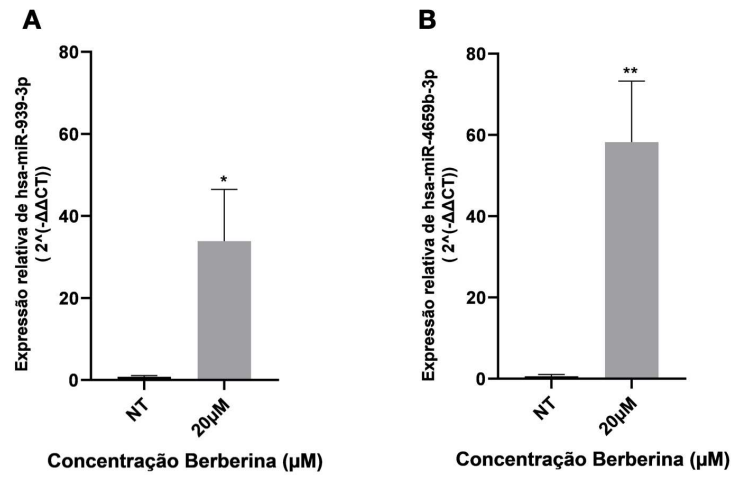
Uma vez compreendendo que o tratamento com os compostos da seção anterior apresentaram efeito antiviral significativo, partimos para confirmar a hipótese de que esse efeito estaria relacionado ao aumento da expressão endógena dos candidatos de miRNA conforme descrito na tabela 2.

Optamos por realizar o ensaio com as linhagens celulares que apresentaram os melhores resultados em cada condição. Desta forma avaliamos a modulação do composto Berberina na linhagem celular MCF-7; do composto Tetraciclina na linhagem A549 e do composto Prednisolona nas linhagens HT1080 e A549.

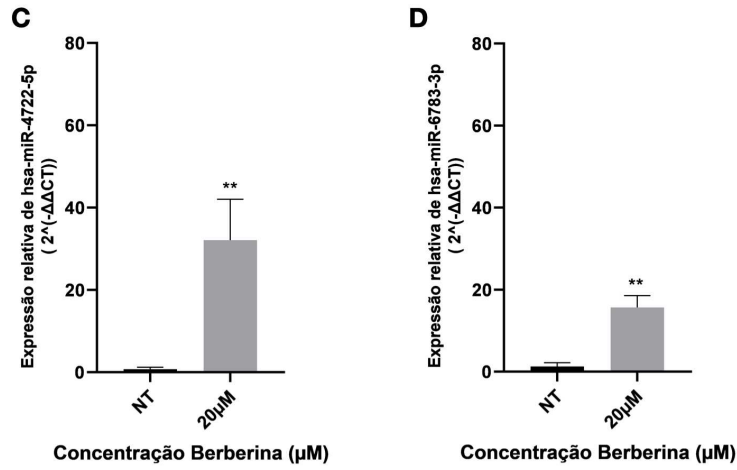
Foi possível verificar na figura 21 (A-D) que o composto Berberina aumentou a expressão endógena dos candidatos de miRNA hsa-miR-939-3p; hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR-4722-3p; e hsa-miR-6783-5p de forma significativa em comparação com o grupo controle de células não tratadas. Os candidatos hsa-miR-939-3p e hsa-miR-4722-3p tiveram um aumento aproximado de 30 vezes mais moléculas em comparação com o grupo controle. O candidato hsa-miR-4659b-3p foi o que apresentou o maior aumento após o tratamento chegando a quase 60 vezes mais moléculas que o grupo controle e o candidato hsa-miR-6783-5p foi o que apresentou o aumento mais brando de expressão apresentando 18 vezes mais moléculas que o grupo controle.

O tratamento com o composto Prednisolona também resultou em ampliação da expressão das moléculas de miRNA endógenas de forma significativa. Para a linhagem celular HT1080 foi possível verificar um aumento de 100 vezes dos candidatos hsa-miR-4659b-3p e hsa-miR-4722-3p mesmo na menor concentração testada de 0,5 mg/mL em comparação com o grupo não tratado (Figuras 21E e 21F). Para a linhagem A549 embora tenha sido possível verificar um aumento significativo na expressão do candidato hsa-miR-4659b-3p em comparação ao grupo controle, esta ampliação se deu de maneira singela através de um aumento de 4 vezes que o grupo controle. Não foi possível verificar alterações na expressão do candidato hsa-miR-4722-3p para essa linhagem celular, nas condições de tratamento estudadas (Figuras 21G e 21H).

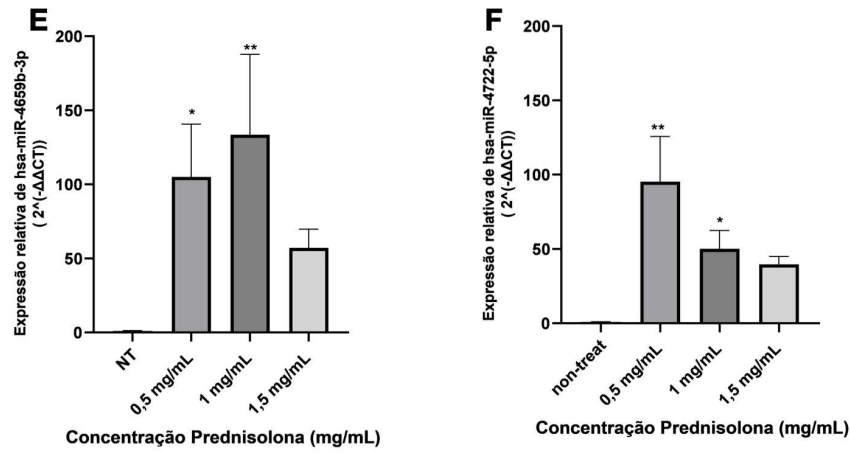
Por fim, também foi possível verificar aumento na expressão do hsa-miR-4786-3p após tratamento com o composto Tetraciclina na linhagem A549. Conforme demonstrado na figura 21I as células tratadas apresentaram aproximadamente 10 vezes mais expressão do candidato de miRNA do que o grupo controle.



MCF7



HT1080



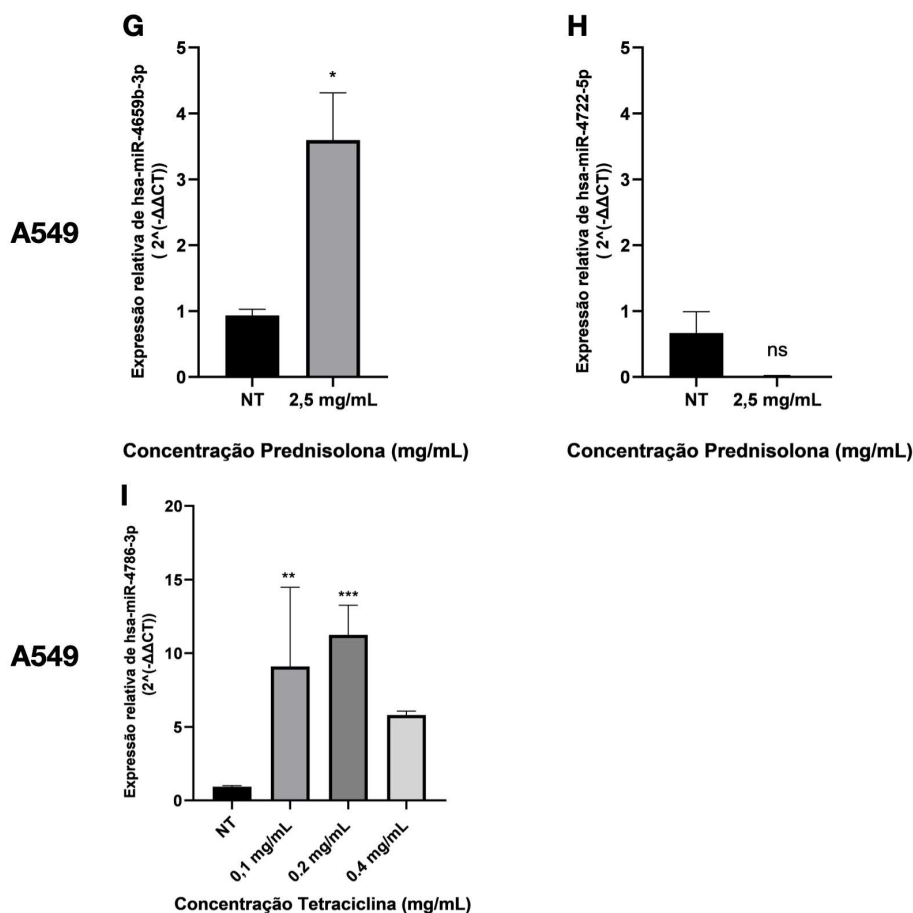


Figura 20- Modulação positiva dos candidatos de miRNA após tratamento com Berberina, Tetraciclina e Prednisolona. (A-D) Linhagem celular MCF7 foram tratadas com composto Berberina na concentração de 20 μ M por um período de 64h. Ao final desse período foi feita a coleta do *pellet* de células, extraído tanto os miRNAs totais quanto RNA total, seguido de síntese das moléculas de cDNA e quantificação qualitativa por qPCR da expressão dos candidatos de interesse com o grupo controle. (E-F) Linhagem celular HT1080 foi tratada com composto Prednisolona nas concentrações de 0,5; 1; e 1,5 mg/mL por um período de 64h. Ao final desse período foi feita a coleta do *pellet* de células, extraído tanto os miRNAs totais quanto RNA total, seguido de síntese das moléculas de cDNA e quantificação qualitativa por qPCR da expressão dos candidatos de interesse com o grupo controle. (G-H) Linhagem celular A549 foi tratada com composto Prednisolona na concentração de 2,5 mg/mL por um período de 64h. Ao final desse período foi feita a coleta do *pellet* de células, extraído tanto os miRNAs totais quanto RNA total, seguido de síntese das moléculas de cDNA e quantificação qualitativa por Q-PCR da expressão dos candidatos de interesse com o grupo controle. (I) Linhagem celular A549 foi tratada com composto Tetraciclina nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4 mg/mL por um período de 64h. Ao final desse período foi feita a coleta do *pellet* de células, extraído tanto os miRNAs totais quanto RNA total, seguido de síntese das moléculas de cDNA e quantificação qualitativa por qPCR da expressão dos candidatos de interesse com o grupo controle. NT representa o grupo das células não tratadas. Os resultados são expressos em média aritmética $\pm$ desvio padrão da média. * $P < 0,005$ relativo ao grupo controle não tratado (Primeira coluna preta) Gráficos representativos de 1 experimento independente.

5. DISCUSSÃO

O ZIKV pode levar ao desenvolvimento de síndromes congênitas graves, indicando um risco a gestantes residentes em áreas com alta propagação do vetor *Aedes*, como o Brasil. Apesar do número de casos contabilizados terem decrescido ao redor do mundo, após a epidemia de 2015, o vírus continua circulante em áreas não atingidas durante esse período e assim como outras espécies de flavivírus (vírus da Dengue, vírus da Febre Amarela) pode reemergir em regiões já afetadas quando a imunidade adquirida da população ao vírus voltar a baixar. Após os grandes surtos infecciosos obteve-se um grande acervo científico com informações sobre o ZIKV, porém apesar dos esforços ainda não existem vacinas ou tratamentos aprovados para uso clínico para esse vírus.

A emergência e reemergência de surtos infecciosos de espécies de flavivírus apresentam um caráter imprevisível e de rápida expansão geográfica, que dificulta o desenvolvimento de pesquisas apenas durante a ocorrência desses eventos, assim, o constante acréscimo de informações e conhecimento sobre esse gênero viral continuam relevantes. Além disso, a expansão do conhecimento científico sobre uma espécie viral pode direcionar o estudo de outras espécies, por exemplo a descoberta do desenvolvimento de síndromes congênitas relacionadas a infecções virais pelo ZIKV direcionaram estudos posteriores onde foi demonstrado que outras espécies de flavivírus também poderiam ocasionar o desenvolvimento de malformações congênitas como o vírus do Oeste do Nilo, vírus de Powassan e até mesmo o vírus da Dengue (PAIXÃO et al., 2018; PLATT et al., 2018). Da mesma forma, informações sobre o processo infeccioso e possíveis metodologias de combate a infecção de MERS-COV e SARS-COV foram essenciais para acelerarem o desenvolvimento de estratégias terapêuticas para o combate do vírus SARS-COV 2 na última pandemia (KIM et al., 2021). Esses fatores indicam que o acúmulo de informações científicas e tecnologias para um determinado vírus podem ser aplicados a outros que possuam características semelhantes e devem ser incentivados, visto que, podem diminuir o tempo e investimento necessário no caso da emergência de surtos infecciosos imprevisíveis.

As metodologias terapêuticas disponíveis no mercado consistem do desenvolvimento de vacinas e da busca de fármacos com capacidade antiviral. Apesar

de serem metodologias bem estabelecidas ao longo dos anos estas ainda apresentam limitações nos seus respectivos processos de pesquisa e desenvolvimento. Vacinas conseguem controlar e prevenir de forma significativa doenças ocasionadas por vírus (ANDRE et al., 2014; MORRISON; PLOTKIN, 2016), porém elas apresentam um processo de pesquisa longo até se tornarem disponíveis para a população (ANDRE et al., 2014; MORRISON; PLOTKIN, 2016) o que diminui seu potencial de ação na emergência de surtos infecciosos que apresentem uma expansão abrupta. Esse problema se tornou ainda mais evidente para o caso do ZIKV, pois uma quantidade significativa de modelos vacinais foram desenvolvidos apresentando bons resultados pré-clínicos, porém não conseguiram avançar nos testes clínicos de eficácia devido a baixa circulação do vírus na população quando a tecnologia tornou-se acessível a ela (POLAND; OVSYANNIKOVA; KENNEDY, 2019). Além disso, existe uma quantidade considerável de vírus circulantes mundialmente, não sendo possível efetuar uma cobertura vacinal para todas as espécies identificadas, e uma vez ausentes as medidas profiláticas aos vírus, a população infectada fica vulnerável aos possíveis danos causados pela infecção viral.

Metodologias terapêuticas convencionais que buscam compostos antivirais também apresentam entraves relacionados aos aspectos operacionais e experimentais (ANDRE et al., 2014; MORRISON; PLOTKIN, 2016), que podem ser mensurados pelo baixo arsenal de compostos disponíveis para uso clínico conquistado ao longo de 50 anos de pesquisa na área (CLERCQ; E., 2016). Fármacos antivirais passam por uma longa peneira seletiva onde precisam interagir e bloquear o ciclo viral sem comprometer o funcionamento celular de maneira tóxica, um fator já complicado visto que a maioria dos processos do ciclo viral são dependentes da maquinaria celular e o bloqueio deste ciclo poderá ocasionar efeitos colaterais. Além disso, nos casos de infecções virais crônicas esses fármacos precisam bloquear o ciclo viral sem escape de partículas virais para evitar processo de seleção. Ainda, infecções ocasionadas pelas espécies de flavivírus apresentam um ciclo infeccioso rápido onde os sintomas clínicos só se tornam evidentes quando o pico viral está em declínio, o que dificulta o uso de metodologias terapêuticas convencionais (CLERCQ; E., 2016).

Buscando alternativas aos problemas discutidos, desenvolvemos o presente trabalho no qual exploramos a modulação farmacológica de miRNAs

endógenos como estratégia para antagonizar a infecção pelo ZIKV. O nosso modelo de estudo, portanto, propõe utilizar a própria maquinaria celular para modular o controle transcricional do genoma viral e bloquear o quadro infeccioso. Essa abordagem também poderia ser desenvolvida para emprego profilático, de forma a tornar as células-alvo menos susceptíveis à infecção e ao desenvolvimento dos quadros virais infecciosos graves.

Em nosso trabalho, exploramos a utilização de ferramentas de bioinformática para identificar miRNAs que apresentaram interação com porções específicas do genoma viral e avaliamos o potencial antiviral desses candidatos, combinando tecnologias *in silico* e *in vitro*. Conforme foi possível observar nos nossos resultados um espectro de mais de 2000 mil moléculas maduras de miRNA apresentaram algum tipo de interação ao longo do genoma viral do ZIKV (Tabela 3). Esse número expressivo demonstra que muitas moléculas de miRNA poderiam ser exploradas com intuito de minimizar a replicação de RNA viral na célula usando diferentes estratégias modulatórias. Além disso, por ser necessário um baixo número de complementariedade de bases da região *seed* dessas moléculas (7 pb) para inativar o RNA viral, moléculas de miRNA estudadas em uma linhagem viral poderiam ser correlacionados com facilidade em outras linhagens virais.

Compreendendo o grande número de possibilidades geradas a partir deste resultado, optamos por refiná-los e fortalece-los buscando apenas os candidatos que apresentaram complementariedade com a quinta parte de cada sequência codificante das proteínas virais. A literatura indica que interações de miRNA com a porção final do mRNA na região 3' UTR apresentam melhor efeito de inativação da tradução desses mRNA (MAYYA; DUCHAINE, 2019). Como o ZIKV forma uma poliproteína que só é clivada após ser traduzida, tentamos buscar candidatos de miRNA que têm como alvo a região final de cada sequência codificante.

Os miRNAs sintéticos apresentam a desvantagem de serem instáveis e de difícil manipulação experimental por serem facilmente expostos a degradação via ação de RNases presentes em abundância no meio ambiente (CHEN et al., 2015). Dessa forma, visando mitigar esse viés optamos por estabelecer um modelo de estudo inicial *in vitro* em que as próprias células passariam a sintetizá-los. Estas linhagens foram geneticamente modificadas com vetores lentivirais codificando um cassete de

expressão constitutiva contendo o microRNA de interesse fusionado à porção 3' do mRNA do gene repórter GFP. As células transduzidas com o vetor viral foram marcadas por GFP para produzir o miRNA de interesse, dessa forma conseguimos assegurar sua expressão através dos perfis de citometria de fluxo (Figura 4).

Optamos por utilizar a linhagem de células VERO nessa primeira fase experimental por ser uma célula de fácil crescimento e manutenção *in vitro*; frequentemente utilizada em estudos com flavivírus; e que apresentou susceptibilidade ao ZIKV com efeito citopático evidente e característico (EKINS et al., 2016).

Conforme observado nos resultados apresentados neste trabalho, 12 dos candidatos de miRNAs selecionados conseguiram reduzir o efeito citopático em decorrência da infecção do ZIKV em cultura de células, que se correlacionou com a redução nos títulos virais. A partir desse resultado inicial conseguimos inferir que a presença de níveis aumentados das moléculas hsa-miR-4722-5p; hsa-miR-939-3p; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-320a-3p; hsa-miR-4786-3p; hsa-miR-3147; hsa-miR-6855-5p; hsa-miR-6783-5p; hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR-7178; e hsa-miR-1909-5p condicionariam a mediação de um efeito antiviral por este sistema (Figura 5 e 6). Esses resultados corroboram para hipótese que essas moléculas poderiam, portanto, antagonizar a progressão da infecção viral.

Ao analisarmos os resultados obtidos nas figuras 5 e 6 com a listagem disponibilizada pelo algoritmo computacional PITA (Tabela 3, Figura Suplementar 1) não encontramos um padrão definido a que pudéssemos vincular os melhores resultados *in vitro* com os candidatos que apresentaram um *score* mais negativo ou mesmo com um maior número de possíveis interações ao longo do genoma viral. Esses resultados indicam que as ferramentas de bioinformática representam instrumentos importantes para direcionar e correlacionar um grande volume de informações de forma ágil, porém elas se baseiam em comandos sistemáticos e modelos matemáticos que apresentam limitações e não conseguem prever todas as informações celulares e moleculares que precisam ser analisadas nos modelos *in vitro* (QUILLET et al., 2020).

De igual forma, ao correlacionarmos os candidatos que apresentaram melhor efeito antiviral nos testes de TCID₅₀ (Figura 5) com suas possíveis interações

com as regiões codificantes (Tabela 1; Figura Suplementar 1) não encontramos um padrão que pudesse direcionar a escolha dos melhores candidatos em função da região de interação. Embora o intuito inicial de nosso trabalho fosse prover uma quantidade igualitária de candidatos a serem testados por região codificante, visando obter dados que pudessem ser equiparados, problemas encontrados no processo de clonagem e estabelecimento das linhagens diminuíram o número de candidatos por região genômica e tornaram inviável uma análise estatística confiável sobre a distribuição desses resultados. Novos estudos podem ser realizados posteriormente com a finalidade de se obter uma quantidade de candidatos de miRNA por região genômica que possibilite uma análise comparativa estatisticamente viável.

As linhagens celulares que supreeexpressaram os candidatos hsa-miR-7974, hsa-miR-4640-5p, e hsa-miR-8089 apresentaram aumento dos valores de TCID₅₀ e título viral quando comparado ao controle segundo os resultados das figuras 5 e 6. Entendemos que ao trabalhar com modelo de expressão endógena essas moléculas de miRNA estariam disponíveis no citoplasma e poderiam estar interagindo não apenas com o genoma do vírus, mas também com moléculas de mRNA da própria célula e isso poderia resultar em efeitos deletérios para a linhagem, resultando em redução no crescimento ou até mesmo morte celular. Ao analisarmos os alvos desses candidatos verificamos que as moléculas apresentam como alvo comum CBARA1 e E2F2. CBARA1 é descrito como um importante regulador da captação de cálcio na mitocôndria, sendo importante na prevenção de estresse celular resultante do acúmulo de cálcio (PHILLIPS; TSAI; TSAI, 2019). E2F2 por sua vez, é um dos membros da família E2F que desempenha importante papel no controle do ciclo celular e de proteínas supressoras de tumor (IVEY-HOYLE et al., 1993). Embora os alvos descritos desempenhem papéis importantes a atividade das células, podendo indicar um efeito *off-target* dos candidatos de miRNA que levaria aumento da citotoxicidade associada a progressão da infecção, estes são alvos ainda classificados como inespecíficos sendo necessário mais estudos para indicar os efeitos da inibição ou ativação destes nas células e a mediação realizada por cada miRNA.

Além disso, CBARA1 e E2F2 também são encontrados como alvo dos candidatos de miRNA que induziram redução do título viral (hsa-miR-4722-3p; hsa-miR-939-3p; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-4786-3p; hsa-miR-6855-5p; hsa-

miR4659b-3p; hsa-miR-6783-3p; hsa-miR-7158-5p; hsa-1909-5p) indicando que poderiam ter pouca relação na mediação da piora da infecção viral.

Em contrapartida, identificamos que o candidato hsa-miR-8089 apresenta como alvo, além das moléculas descritas acima, a molécula ReLA (uma subunidade de *Nuclear fator-kappa B*, NF- κ B) podendo inativar sua expressão na célula (DALAN et al., 2017). NF- κ B é descrito como um importante fator transcricional envolvido nas respostas imunocelulares e inflamatórias (GIULIANI; BUCCI; NAPOLITANO, 2018). Sendo assim, sua inativação pelo miRNA hsa-miR-8089 seria um dos fatores que corroborariam para uma maior replicação viral e efeito citotóxico após a infecção celular.

As moléculas selecionadas para nosso estudo e que demonstraram resultados positivos (Figura 5 e 6) apresentam poucos estudos descritivos a respeito de seus alvos na literatura, salvo raras exceções como o candidato hsa-miR-1301-3p, que possui interação com 166 moléculas, sendo 22 descritas como de inibição. A maioria dos alvos tiveram interação indicada apenas por modelos de estudo computacionais, e por isso ainda são classificadas como inespecíficas. Assim apesar de termos avaliados os alvos dos candidatos que seguiriam para as próximas etapas experimentais, não consideramos suas informações como suficientemente robustas para eliminar o uso dessas moléculas nas etapas subsequentes.

A literatura indica que ao menos metade dos miRNAs descritos são classificados como intragênicos, sendo processados a partir de regiões intrônicas (O'BRIEN et al., 2018). Levando isso em consideração compreendemos que a melhor forma de aumentar a expressão dessas moléculas de forma endógena seria a partir da modulação das proteínas nas quais suas sequências genômicas estariam inseridas. Os dados levantados na tabela 2 e ilustrados pelas figuras de 7 à 15 demonstram que as proteínas vinculadas aos miRNAs apresentam diferentes funcionalidades celular, interagindo com uma diversidade de vias e moléculas. A proteína DNMT3A vinculada ao miRNA hsa-miR-1301-3p apresenta um dos *networks* mais complexos (Figura 9). Tendo em vista que o aumento da expressão dessas proteínas na célula também pode afetar o sistema celular as próximas etapas experimentais foram conduzidas buscando o equilíbrio entre a melhor alternativa terapêutica e os mecanismos que poderiam ser alterados em função desta terapia.

Assim ao buscarmos com quais fármacos trabalharíamos levamos em consideração alguns fatores como a preferência por vias que tinham uma interação direta ou em até 2 nodos de distância, compreendo que dessa forma o efeito modulatório seria mais expressivo; também optamos por escolher vias comuns a mais de um candidato; entendendo que o efeito antiviral final poderia ser mais significativo tendo dois ou mais candidatos diferentes interagindo com o genoma viral; e trabalhamos com vias que não possuíam muitas atividades secundárias com outras moléculas, tentando mitigar possíveis efeitos citotóxicos colaterais. Um exemplo desse processo foi que optamos por não usar compostos modulatórios do sistema *GATA-Group* compreendendo que essa via possui interações de ativação e inibição com uma quantidade muito grande de moléculas.

A via AHR (*aryl hydrocarbon receptor*) foi identificada em 6 (hsa-miR-4722-5p; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-939-3p; hsa-miR-4785-3p; hsa-miR-4659b-3p; hsa-miR6783-3p) de 8 dos candidatos de miRNA selecionados (Tabela 2). Ela caracteriza-se por ser uma via conservada em mamíferos tendo funcionalidade associada a regulação de respostas biológicas a hidrocarbonetos aromáticos planares, mediando efeitos adversos causados por poluentes externos. Embora seu mecanismo de ação ainda não seja completamente elucidado, ela apresenta alta funcionalidade em tecidos epiteliais, pulmonares, placentais e intestinais (AVILLA et al., 2020; ZHOU, 2016). Além desses fatores, os compostos que poderiam modulá-la segundo a plataforma seriam Berberina, Omeprazol e Curcumina. Estes compostos caracterizam-se por já serem aprovados para uso em agências regulatórias, acessíveis a população e que poderiam ser facilmente testados no nosso modelo de estudo e por esse motivo foram selecionados para os testes subsequentes.

Os receptores nucleares de glicocorticoides (GCR) apresentaram interação com moléculas de 4 (hsa-miR-4722-5p; hsa-miR-1301-3p; hsa-miR-4659b-3p; e hsa-miR-1909-5p) dos 8 candidatos de miRNA em análise (Tabela 2). Esse grupo de moléculas possui importante função regulatória pós-transcricional de vários processos biológicos, exercendo papéis no crescimento, desenvolvimento e manutenção da homeostase celular para reverter quadros de estresse (NICOLAIDES; CHARMANDARI; CHROUSOS, 2018; TIMMERMANS; SOUFFRIAU; LIBERT, 2019). Segundo os dados de bioinformática essa classe de moléculas pode ter suas expressões reguladas por compostos corticosteroides como Dexametasona e

Prednisolona. Esses compostos também possuem as características anteriormente mencionadas e por esse motivo foram selecionados.

A via PXR/RXR-alpha (*Pregnane X Receptor/ Retinoic acid receptor*) também representa um complexo de receptores nucleares que são responsáveis pela regulação de genes alvos em resposta a ação de hormônios esteroides e/ou xenobióticos (CHEN et al., 2018). Ela demonstrou ter funcionalidade modulatória para o candidato hsa-miR-4786-3p via tratamento com o composto Tetraciclina (Tabela 2). Por ser esse um composto com características desejáveis e que já havia apresentado potencial inibitório ao vírus da Dengue (ROTHAN et al., 2013), optamos por selecioná-la.

A via SMAD1 pertence a superfamília de moléculas SMAD que atua como transdutores de sinais para TGF- β tendo papel importante nos processos regulatórios de crescimento e desenvolvimento celular (BABURAJENDRAN et al., 2010) . Ela demonstrou interagir e modular a proteína vinculada ao candidato hsa-miR-1301-3p (Tabela 2) através do composto Levo-Tiroxina e também foi selecionada.

Berberina é um alcaloide natural, extraído de diversas espécies de plantas medicinais e que tem apresentado ampla funcionalidade terapêutica. Estudos tem mostrado que seu uso pode regular e até mesmo reverter problemas inflamatórios, de regulação metabólica e infecções virais (NEAG et al., 2018). No contexto de infecções virais o composto mostrou eficiência ao reduzir a atividade de uma gama de espécies virais usando mecanismos de ação variado, como Chikungunya (VARGHESE et al., 2016); Herpes Simplex (SONG et al., 2014); Papiloma vírus (MAHATA et al., 2011); Zika vírus (ROBINSON et al., 2018); e no estudo mais recente, Dengue vírus (RATANAKOMOL et al., 2021). De igual forma nossos resultados mostraram que o tratamento de linhagens celulares de diferentes tecidos com o composto Berberina também resultaram em diminuição expressiva do título viral, conseguindo reduzir em alguns casos em mais de 90% o resultado observado na maior concentração testada (Figura 16). Assim como nos estudos já publicados, o composto apresentou baixa citotoxicidade em nossos experimentos (Figura 16), apresentando morte celular acima de 50% em apenas uma das cinco linhagens analisadas. O uso desse composto para modular a expressão dos candidatos de miRNA também se mostrou efetivo, no qual 4 (hsa-miR4659b-3p, hsa-miR-4722-5p, hsa-miR-939-3p, e hsa-miR-6783-5p) dos 6

candidatos propostos tiveram seus níveis de expressão aumentados na célula após o tratamento (Figura 21).

Ao analisarmos os resultados dos cinco compostos utilizados em nosso trabalho (Figuras 16 – 20), verificamos que aquele que apresentou melhor diminuição dos títulos virais em um número maior de linhagens celulares foi o composto Berberina. Isso apresenta um indicativo de um dos fatores discutidos acima de que quanto mais candidatos de miRNA fossem modulados pelo mesmo composto, melhor seria o efeito inibitório final observado. Estudos futuros usando linhagens geneticamente modificadas que contenham sequências antimirs de cada candidato poderão demonstrar o nível de contribuição que cada candidato apresenta à inibição viral, assim como reforçar a hipótese discutida acima.

Através de análises na plataforma METACORE não encontramos uma correlação entre as vias descritas na literatura que apresentam interação com Berberina e que contribuiriam para inativação de outros tipos virais com a ativação de AHR abordada em nosso estudo. Contudo, observamos que AHR pode interagir com IRF4 (*Interferon regulatory factor 4*) formando um complexo que pode ativar expressão de IL-2. Essa citocina possui papel importante na resposta imunológica celular, principalmente na proliferação, diferenciação e maturação de células T, e B (ROSS; CANTRELL, 2018). Esse fator poderia ampliar o efeito modulatório final observado pelo composto Berberina.

Em contrapartida, assim como AHR pode se complexar com IRF4 e ativar IL-2, a ativação de AHR também pode influenciar na ativação de FOXP3 (*Fork head box P3*). Esta é uma via de regulação pós-transcricional importante para diferenciação de células T em células T regulatórias (Tabela 2). Essa classe de células é bastante descrita e caracterizada por seu papel imunossupressor (LU; BARBI; PAN, 2017). Em um contexto inicial de infecção consideraríamos esse fator como prejudicial, porém ao observarmos que a ativação excessiva do sistema imunológico também pode levar ao desenvolvimento de quadros graves e prejudiciais ao organismo (CATANZARO et al., 2020), acreditamos que trabalhar com uma molécula que apresenta uma maleabilidade de equilibrar um quadro de vigilância imunológica (favorecer o combate ao vírus) quanto tolerância (regular a resposta imune excessiva) traria um melhor efeito terapêutico. Estudos futuros poderão direcionar a relevância

em termos de ativação e inibição da via AHR e por consequência de IL-2 e FOXP3 no contexto de infecções virais.

Assim como Berberina, o composto Omeprazol também é predito por modular a via AHR (Tabela 2) e teve seu efeito testado em função do possível aumento de expressão dos candidatos de miRNAs analisados em nosso estudo (Figura 19). Esse composto apresenta como característica seu efeito inibitório da bomba de prótons, sendo popularmente utilizado para o tratamento de doenças gastrointestinais através da regularização do pH destas células (FRIEDLANDER et al., 2010). Estudos recentes têm apontado benefícios antivirais em seu uso para o tratamento de infecções de Herpes Simplex (MICHAELIS et al., 2019^a), e vírus Influenza (GASPARINI et al., 2014). De acordo com nossos resultados o composto Omeprazol, conseguiu reduzir a infecção viral de maneira significativa apenas nas células SHSY-5Y e HT1080 (Figura 19). Esses resultados contrapõem o observado seguindo o mesmo delineamento experimental do composto Berberina, indicando que seguindo a nossa metodologia esse composto teria pouca capacidade para modular a expressão dos candidatos de miRNA através da modulação de AHR, e optamos por não realizar os ensaios de qPCR para esse tratamento.

Em nossos estudos utilizamos uma faixa de dosagem baixa, quando comparado com aquelas em que o fármaco apresentou função efetiva (GASPARINI et al., 2014; JIN et al., 2020; MICHAELIS et al., 2019b), sendo esse um dos possíveis pontos que explicariam os resultados alcançados. A literatura indica um tratamento com uma dosagem 10 vezes maior do que a que utilizamos para que esse composto conseguisse modular a via AHR e apresentar reflexos terapêuticos mediados por esse sistema (JIN et al., 2020). Embora fosse possível o desenvolvimento de estudos futuros visando uma melhora dos efeitos farmacocinéticos da molécula, entendemos que o composto Berberina seria um melhor candidato para modular a via AHR e teria melhores aplicações terapêuticas.

Prednisolona pertence a classe de compostos glicocorticoides utilizados no tratamento de problemas inflamatórios e de doenças autoimunes. Embora esse grupo de compostos tenha seu uso contestado em função de seus possíveis efeitos adversos, estudos envolvendo o uso de corticosteroides em pacientes que apresentam quadros graves de infecções virais mostraram melhora significativa do

quadro (THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP*, 2021; VANDEWALLE; LIBERT, 2020).

Assim como outros corticosteroides, a Prednisolona foi predita em nossos estudos por conseguir interagir e modular o receptor nuclear GCR (Tabela 2), que por sua vez conseguiria interagir com outras vias (KLF17; GLIS3) e aumentaria a expressão de 4 candidatos de miRNA. Nossos resultados demonstraram que o tratamento das células com este composto induziram uma redução da carga viral significativa nas quatro linhagens celulares testadas, porém de uma forma mais eficiente nas linhagens celulares pulmonares (Figura 18). Os dados apontam que apesar de estar presente em quantidades variáveis na maioria dos tecidos celulares, sua expressão é mais acentuada em células pulmonares (FAGERBERG et al., 2014). Esse fator contribuiria para o entendimento dos resultados alcançados, uma vez que, sendo mais expresso nesses tecidos, essas células seriam melhor moduladas por Prednisolona e por consequência apresentariam melhor inibição viral.

Os ensaios de citotoxicidade mostraram que o tratamento com esse composto apresentou efeito citotóxico em pelo menos uma das concentrações de todas as linhagens analisadas (Figura 18), apresentando características citotóxicas mais enunciadas que os demais compostos analisados. As células SHSY-5Y, em especial, apresentaram efeito citotóxico expressivo ao tratamento com Prednisolona e por esse motivo não tiveram seus dados computados neste trabalho. Usamos em nossos testes *in vitro* a formulação comercial de Prednisolona (Predsim® Infantil 11mg/mL) que apresenta na sua composição uma série de excipientes. Acreditamos que pelos modelos *in vitro* apresentarem uma sensibilidade maior a alterações no meio de cultura, o efeito citotóxico observado poderia ter correlação com os excipientes, que assim como o composto Prednisolona foram diluídos ao meio de cultura celular. Estudos futuros poderão ser conduzidos com o composto de padrão analítico para verificar os pontos questionados acima. De igual forma, acreditamos que apesar do perfil um pouco mais citotóxico do que os outros candidatos, seus efeitos antivirais superariam os efeitos adversos e os benefícios de seu uso deveriam ser melhor explorados.

Conforme já discutido anteriormente, a modulação de mais de um candidato de miRNA usando um mesmo composto seria preferível. Os dados

apresentados na figura 21 mostram que a modulação dos miRNAs hsa-miR-4659b-3p e hsa-miR-4722-5p pelo tratamento com Prednisolona foi significativo na célula HT1080. O aumento expressivo de até 100 vezes na expressão de miRNA dos candidatos computados indicam sua possível atuação no processo de inibição viral. As células A549 por sua vez, embora tenham apresentado um aumento na expressão do candidato hsa-miR-4659b-3p, não apresentou aumento de hsa-miR-4722-5p e os valores observados foram menos expressivos. Conforme apresentado nos resultados desse trabalho (Figura 18), uma concentração maior de composto foi necessária no tratamento dessas células para observar os efeitos inibitórios comparáveis com a outra linhagem celular pulmonar. Isso demonstrou uma menor sensibilidade dessas células ao tratamento com Prednisolona que poderia estar relacionada a biodistribuição dos receptores de GCR nessa célula em especial.

Outro ponto a ser observado é que o sistema de modulação dos candidatos com Prednisolona para esses candidatos, envolve a modulação de duas vias (GCR→KLF17→miRNA) para que haja aumento da síntese das moléculas de miRNA. KLF17 (*KLF transcription fator 17*) é descrito por favorecer a ligação de moléculas de DNA fita dupla, envolvida nos processos transcripcionais, embora tendo sido identificado em células pulmonares, sua expressão demonstrou ser reduzida nessas linhagens quando comparado com o descrito para GCR (FAGERBERG et al., 2014). Assim, mesmo que as células A549 tivessem níveis equiparáveis de GCR às células HT1080, elas poderiam ter expressão de KLF17 reduzida e por isso o efeito final de modulação dos candidatos de miRNA não foi tão pronunciado.

Ainda, em nossos estudos quantificamos apenas dois dos quatro miRNAs possíveis de modulação com Prednisolona (Figura 21). Além da via GCR→KLF17→miRNA; o tratamento com esse composto também possibilitaria modulação dos candidatos hsa-miR-1301-3p, e hsa-miR-1909-5p pela via GCR→GLIS3→miRNA. GLIS3 é descrito por ter ação regulatória nos processos transcripcionais, sendo importante no desenvolvimento de células do pâncreas e da tireoide (KIM, 2003), que apresenta uma biodistribuição aproximadamente 6 vezes maior em células pulmonares que KLF17 (FAGERBERG et al., 2014). Dessa forma, entendemos que o efeito antiviral observado nas células A549 tratadas com Prednisolona poderia ter mais ação da via GLIS3 e ser mediado pelos candidatos hsa-miR-1301-3p e hsa-miR-1909-5p. Estudos quantificando a expressão desses outros

dois candidatos poderão ser realizados para garantir um melhor entendimento dos resultados alcançados.

Ao compararmos os resultados obtidos com o composto Berberina e com o composto Prednisolona, compreendemos que quanto mais vias/moléculas forem necessário ser moduladas, mais complexo será a rede de biodistribuição dessas vias/moléculas nos tecidos celulares e por consequência menor poderá ser o efeito total observado. Berberina modula AHR uma via conservada presente em muitos tecidos celulares e apresentou melhores efeitos inibitórios em todas as linhagens analisadas, enquanto Prednisolona modula GCR, que modula KLF17 ou GLIS3, vias que apresentam um padrão de distribuição mais tecido específico e apresentou maior variações na eficiência inibitória entre as células analisadas.

O composto Tetraciclina pertence a uma classe de antibióticos de amplo espectro com funcionalidade descrita a mais de cinquenta anos e que tem demonstrado ampla aplicação terapêutica em infecções bacterianas e virais. Possui aplicabilidade tanto de forma direta através da inibição das proteínas ribossomais bacterianas, como modulando metaloproteinases, espécies reativas de oxigênio, caspases importantes para efeitos anti-apoptóticos e vias anti-inflamatórias como ERK1/2/MAPK(MOSQUERA-SULBARAN; HERNÁNDEZ-FONSECA, 2021). Recentemente o tratamento com esse composto demonstrou inibição viral do vírus da dengue (ROTHAN et al., 2014), e da Zika (ABRAMS et al., 2020). De igual forma, os resultados apontados em nosso trabalho (Figura 17) mostraram que o tratamento com o composto Tetraciclina apresentou resultados inibitórios satisfatórios em quatro das cinco linhagens analisadas, demonstrando um baixo perfil de citotoxicidade. A linhagem A549 foi a que apresentou maior sensibilidade ao tratamento com o composto, apresentando bons resultados de inibição já na menor concentração testada (0,05 mg/mL) e reduzindo em aproximadamente 90% o título viral observado na maior concentração analisada (0,2 mg/mL). Devidos aos seus bons resultados ela foi direcionada para os ensaios de quantificação dos candidatos de miRNA e observamos que o candidato hsa-miR-4786-3p apresentou expressão aumentada em até 10 vezes na melhor concentração inibitória de tratamento com o composto. Esses resultados corroboram com o efeito inibitório observado podendo indicar um dos mecanismos de ação da Tetraciclina em células infectadas com o ZIKV.

Embora o tratamento com derivados de Tetraciclina tenha efeito inibitório ao ZIKV já descritos na literatura (ABRAMS et al., 2020), o mecanismo pelo qual esse efeito é observado ainda não foi completamente elucidado. Os ensaios com Metilciclina demonstraram pouca inativação da protease viral em função do tratamento, quando comparado com o efeito inibitório observado. Esses resultados indicam que a Tetraciclina (e derivados) poderia utilizar outros mecanismos modulatórios para reduzir a carga viral nas células infectadas, no qual a inibição via aumento da expressão de candidatos de miRNA que inativem o genoma viral pode ser um dos mecanismos empregado. Estudos futuros com as linhagens contendo o gene antimir poderão elucidar melhor a porcentagem de ação deste mecanismo.

Assim como o observado para Prednisolona, a modulação de miRNA por Tetraciclina é mediante modulação de duas vias (PXR/RXR- α →coREST complex/LSD1→miRNA). Isso poderia explicar o porquê de que embora o tratamento tenha aumentado a expressão do candidato hsa-miR-4786-3p isso não seria em valores tão expressivos quanto os observados para os demais candidatos analisados. O estudo do aumento da expressão desse candidato em outras linhagens celulares nas quais também foi observado efeito inibitório poderão confirmar se este fato estaria relacionado a biodistribuição dessas moléculas nas células.

Ao contrário do que foi observado para Prednisolona, embora o tratamento com Tetraciclina envolvesse a modulação de apenas um candidato, os efeitos inibitórios observados foram mais significativos e abrangeram um número maior de células. Dois fatores poderiam indicar esses resultados, o primeiro seria a biodistribuição celular desses complexos nas células analisadas em nosso estudo, e o segundo poderia ser em função da potência de inibição do genoma viral vinculada a cada molécula de miRNA. Se compararmos os resultados observados na primeira etapa deste projeto, as células que apresentavam superexpressão de hsa-miR-4786-3p, apresentaram melhor redução do efeito citopático e títulos virais observados que os candidatos hsa-miR-4659b-3p e hsa-miR-4722-5p. Esse ponto também poderá ser respondido ao analisarmos os resultados das células que apresentarem as sequencias de antimirs.

A Levo-tiroxina é um composto utilizado para tratamento e reposição hormonal de problemas na glândula de tireoide (EGHTEDARI B, 2022). Embora a

literatura não disponha de relações entre seu uso e possíveis atividades antivirais, as análises disponibilizadas pela plataforma METACORE indicaram seu possível uso para modulação do candidato hsa-miR-1301-3p (Tabela 2) e optamos por explorar melhor seus efeitos em nosso modelo. Os resultados referentes ao tratamento com o composto Levo-tiroxina demonstraram baixa atividade inibitória ao ZIKV dentro da faixa de concentrações testadas. Apenas as células MCF-7 apresentaram redução significativa dos títulos virais na maior concentração testada de 40 μ M, porém com ligeira citotoxicidade associada ao tratamento (Figura 20). Devido a pouca expressividade alcançada na inibição viral mediada pelo tratamento com este composto, assim como o perfil citotóxico associado a concentração em que obtivemos os melhores resultados optamos por não aprofundar os estudos com esse fármaco. A baixa maleabilidade de seu uso entre efeito antiviral e citotoxicidade foi considerada como negativa, uma vez que os outros compostos apresentaram melhores resultados.

Assim de acordo com os pontos discutidos acima, compreendemos que dentre os cinco compostos avaliados em função de sua capacidade modulatória de miRNAs e inibitória ao ZIKV, aqueles que apresentaram os melhores resultados foram Berberina, Tetraciclina e Prednisolona, dentre os quais, Berberina é o composto que apresentou melhor aplicabilidade terapêutica futura. Esse fitoterápico de origem natural demonstrou regular positivamente 4 candidatos diferentes de miRNA em valores expressivos e satisfatórios. Sua via de modulação por AHR presente em vários tecidos, possibilita uma ampliação dos efeitos antivirais desejáveis. De igual forma, os efeitos secundários da ativação de AHR como modulação das respostas imunes ampliaria sua eficácia no combate a infecções virais. Embora o composto Berberina já tenha sido descrito por apresentar efeito inibitório ao ZIKV e outras espécies de arbovírus, o mecanismo inibitório apontado em nossos estudos de efeito antiviral mediado por miRNAs é inovador e representa um avanço em pesquisas nessa área.

Uma diversidade de formulações do composto Berberina já se encontram disponíveis a população para uso, com perfis de segurança já descritos e aprovados por agências regulatórias, sendo um bom candidato para reproposição farmacológica. Seu uso durante o período gestacional, ainda é descrito como indesejável, devido a capacidade do composto de transpassar a barreira-placentária. Contudo estudos envolvendo sua aplicabilidade para reverter problemas de fertilidade têm sido desenvolvidos com resultados satisfatórios e seu perfil de aplicação durante o primeiro

trimestre gestacional, provavelmente deverá ser aprofundado e revisto (RONDANELLI et al., 2020).

Tetraciclina e Prednisolona também apresentaram resultados satisfatórios e inovadores mostrando a possibilidade de uso desses compostos para inativação do ZIKV através da metodologia de modulação da expressão endógena de miRNA, porém a dosagem de uso de ambos os compostos foi significativamente superior à utilizada para o composto Berberina. Estudos futuros poderão ser conduzidos utilizando combinação destes três compostos visando diminuir as doses necessárias para se alcançar os melhores efeitos modulatórios e diminuir possíveis efeitos adversos.

Assim como Berberina, Tetraciclina e Prednisolona também são compostos classificados como de uso não recomendável durante período gestacional. Tetraciclina também possui capacidade de cruzar a barreira placentária e poderia causar efeitos adversos ao feto (NAHUM; UHL; KENNEDY, 2006), contudo derivados sintéticos dessa classe de antibióticos têm sido reformulados com o intuito de diminuir esses possíveis efeitos adversos e ampliar aplicabilidade farmacológica nesse grupo populacional (DAMKIER et al., 2019; WORMSER et al., 2019). Prednisolona tem seu uso não recomendável para gestantes, em função de seus efeitos imunossupressores (BANDOLI et al., 2017; SOLANO; ARCK, 2020). Contudo assim como no caso de Tetraciclina, ambos os tratamentos são recomendados quando os riscos são mais eminentes do que os possíveis efeitos adversos.

Considerando a gravidade das malformações neurológicas associadas as infecções com o ZIKV assim como a ausência de tratamentos alternativos, o uso dos compostos descritos nesse trabalho seria benéfico e favoráveis a população mais vulnerável.

Por fim, nossa metodologia demonstrou a possibilidade de identificar candidatos de miRNA que apresentam interação no genoma viral de forma eficiente através do uso das ferramentas de bioinformática. O uso de uma abordagem mais racional, combinando as predições alcançadas com o algoritmo, com a distribuição dessas ligações ao longo das regiões codificantes ampliaram o espectro de resultados positivos. De igual forma a análise das vias e moléculas possíveis de modulação endógena através do tratamento com candidatos de compostos farmacológicos

preditos pela plataforma METACORE agilizaram e fortaleceram os resultados alcançados em nossos experimentos.

Conseguimos demonstrar que a própria maquinaria celular pode ser usada para inibir a replicação do vírus na célula, e que embora esta tenha seu metabolismo alterado durante processos infecciosos para favorecer a propagação viral, o uso de miRNAs presentes em sequências codificantes de proteínas importantes tanto à célula quanto ao vírus impediriam sua regulação negativa e poderiam ter seus valores aumentados estrategicamente por compostos para inibir a infecção viral e seus efeitos adversos ao organismo.

Os estudos apresentados e discutidos em nosso trabalho demonstraram resultados inovadores e motivantes que poderão ser fortalecidos no futuro com estudos *in vivo* e/ou usando as tecnologias de *órgãos-on-chip* para verificar a eficiência dessa abordagem num contexto sistêmico. Além disso, essas outras abordagens poderão direcionar o perfil de segurança e eficácia no uso desses compostos de forma profilática com o intuito de diminuir o desenvolvimento de casos de síndrome congênita do ZIKV. Adicionalmente, nossa estratégia de inibição viral por modulação de miRNA endógeno também pode ser empregada para outros vírus de genoma de RNA positivo.

6. CONCLUSÃO

Buscamos através de nossos estudos analisar a prospecção de moléculas de miRNA com atividade antiviral ao ZIKV como uma alternativa terapêutica. Nosso alvo consistiu em induzir a expressão endógena destes miRNAs para inibir o ZIKV. Assim, de acordo com os dados apresentados e discutidos ao longo desse trabalho de doutorado, e com os objetivos propostos concluimos que essas moléculas de miRNAs conseguem de fato inibir a expressão viral, minimizando e em alguns casos reduzindo por completo o efeito citopático ocasionado pela progressão da infecção *in vitro*.

Em nosso modelo combinamos o estudo *in silico* e *in vitro* para determinação de alvos e candidatos farmacológicos. Conseguimos identificar um número expressivo de candidatos de miRNAs que apresentaram interação com o genoma viral do ZIKV de forma simples e eficiente, que poderá ser facilmente reproduzida no estudo de outras espécies virais.

Os fármacos que apresentaram a capacidade de induzir o aumento da expressão das moléculas de miRNA poderão ser melhor investigados em modelos de estudos *in vivo* e em *órgãos on-a-chip* para avaliar os efeitos sistêmicos do uso dessa estratégia terapêutica, assim como estudar a eficiência e segurança dessa metodologia para o tratamento profilático da população mais vulnerável, no caso de epidemias do ZIKV, associadas à mal formações em recém-nascidos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABRAMS, R. P. M. et al. Therapeutic candidates for the Zika virus identified by a high-throughput screen for Zika protease inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 117, n. 49, p. 31365–31375, 8 dez. 2020.
- AFRICANDER, D. J.; STORBECK, K.-H.; HAPGOOD, J. P. A comparative study of the androgenic properties of progesterone and the progestins, medroxyprogesterone acetate (MPA) and norethisterone acetate (NET-A). **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 143, p. 404–15, set. 2014.
- ANDRE, F. E. et al. Bulletin of the World Health Organization Vaccination greatly reduces disease, disability, death and inequity worldwide. p. 1–12, 2014.
- ARBUTHNOT, P. MicroRNA-like antivirals. **Biochimica et Biophysica Acta - Gene Regulatory Mechanisms**, v. 1809, n. 11–12, p. 746–755, 2011.
- AVILLA, M. N. et al. The Ah Receptor: Adaptive Metabolism, Ligand Diversity, and the Xenokine Model. **Chemical Research in Toxicology**, v. 33, n. 4, p. 860–879, 20 abr. 2020.
- AVTANSKI, D. B. et al. Honokiol activates LKB1-miR-34a axis and antagonizes the oncogenic actions of leptin in breast cancer. **Oncotarget**, v. 6, n. 30, p. 29947–62, 6 out. 2015.
- AZOUZ, F. et al. Integrated MicroRNA and mRNA profiling in zika virus-infected neurons. **Viruses**, v. 11, n. 2, p. 1–22, 2019.
- BABURAJENDRAN, N. et al. Structure of Smad1 MH1/DNA complex reveals distinctive rearrangements of BMP and TGF- β effectors. **Nucleic Acids Research**, v. 38, n. 10, p. 3477–3488, jun. 2010.
- BAI, X. T.; NICOT, C. MiR-28-3p is a cellular restriction factor that inhibits human T cell leukemia virus, type 1 (HTLV-1) replication and virus infection. **Journal of Biological Chemistry**, v. 290, n. 9, p. 5381–5390, 2015.
- BAJGELMAN, M. C.; COSTANZI-STRAUSS, E.; STRAUSS, B. E. Exploration of critical parameters for transient retrovirus production. **Journal of Biotechnology**, v. 103, n. 2, p. 97–106, 2003.
- BANDOLI, G. et al. A Review of Systemic Corticosteroid Use in Pregnancy and the Risk of Select Pregnancy and Birth Outcomes. **Rheumatic Disease Clinics of North America**, v. 43, n. 3, p. 489–502, ago. 2017.
- BARROWS, N. J. et al. A Screen of FDA-Approved Drugs for Inhibitors of Zika Virus Infection. **Cell Host and Microbe**, p. 259–270, 2016.
- BARTEL, D. P. MicroRNAs : Genomics , Biogenesis , Mechanism , and Function. v. 116, p. 281–297, 2004.
- BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 2017.
- BAYERL, J. et al. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. **Cell stem cell**, v. 28, n. 9, p. 1549- 1565.e12, 2 set. 2021a.
- BAYERL, J. et al. Principles of signaling pathway modulation for enhancing human naive pluripotency induction. **Cell stem cell**, v. 28, n. 9, p. 1549- 1565.e12, 2 set. 2021b.

- BHATTACHARYA, S. et al. Basic helix-loop-helix protein E47-mediated p21Waf1/Cip1 gene expression regulates apoptosis of intestinal epithelial cells. **The Biochemical journal**, v. 407, n. 2, p. 243–54, 15 out. 2007.
- BOSKOVIC, G.; NILES, R. M. T-box binding protein type two (TBX2) is an immediate early gene target in retinoic-acid-treated B16 murine melanoma cells. **Experimental cell research**, v. 295, n. 2, p. 281–9, 1 maio 2004.
- BRASIL, P. et al. Zika virus infection in pregnant women in rio de janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 2016.
- BRENT, G. A. The molecular basis of thyroid hormone action. **The New England journal of medicine**, v. 331, n. 13, p. 847–53, 29 set. 1994.
- BRUSCELLA, P. et al. Viruses and miRNAs: More friends than foes. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. MAY, p. 1–11, 2017.
- CACERES-CORTES, J. R. et al. Steel factor sustains SCL expression and the survival of purified CD34+ bone marrow cells in the absence of detectable cell differentiation. **Stem cells (Dayton, Ohio)**, v. 19, n. 1, p. 59–70, 2001.
- CASTRILLÓN-BETANCUR, J. C.; URCUQUI-INCHIMA, S. Overexpression of miR-484 and miR-744 in Vero cells alters Dengue virus replication. v. 112, n. April, p. 281–291, 2017.
- CASTRO, F. L. et al. MicroRNAs 145 and 148a Are Upregulated During Congenital Zika Virus Infection. **ASN Neuro**, v. 11, 2019.
- CATANZARO, M. et al. Immune response in COVID-19: addressing a pharmacological challenge by targeting pathways triggered by SARS-CoV-2. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 5, n. 1, p. 84, 29 dez. 2020.
- CAUCHEMEZ, S. et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–15: A retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.
- CHAUHAN, B. K. et al. Identification of genes downstream of Pax6 in the mouse lens using cDNA microarrays. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 13, p. 11539–48, 29 mar. 2002.
- CHEN, H. et al. Calcineurin A gamma and NFATc3/SRPX2 axis contribute to human embryonic stem cell differentiation. **Journal of cellular physiology**, v. 236, n. 8, p. 5698–5714, ago. 2021.
- CHEN, L. et al. Overview of the structure-based non-genomic effects of the nuclear receptor RXR α . **Cellular & Molecular Biology Letters**, v. 23, n. 1, p. 36, 7 dez. 2018.
- CHEN, S.-T. et al. Modifications of the fibroblast growth factor-2 gene led to a marked enhancement in secretion and stability of the recombinant fibroblast growth factor-2 protein. **Journal of cellular biochemistry**, v. 100, n. 6, p. 1493–508, 15 abr. 2007a.
- CHEN, W. et al. Conversion of peripheral CD4+CD25- naive T cells to CD4+CD25+ regulatory T cells by TGF-beta induction of transcription factor Foxp3. **The Journal of experimental medicine**, v. 198, n. 12, p. 1875–86, 15 dez. 2003.
- CHEN, Y. et al. Integration of genome and chromatin structure with gene expression profiles to predict c-MYC recognition site binding and function. **PLoS computational biology**, v. 3, n. 4, p. e63, 6 abr. 2007b.

CHEN, Y. et al. **Bottleneck limitations for microRNA-based therapeutics from bench to the bedside.** *PharmazieGovi-Verlag Pharmazeutischer Verlag GmbH*, , 1 mar. 2015.

CHIU, S. K. et al. A novel role for Lyl1 in primitive erythropoiesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 145, n. 19, 11 out. 2018a.

CHIU, S. K. et al. A novel role for Lyl1 in primitive erythropoiesis. **Development (Cambridge, England)**, v. 145, n. 19, 11 out. 2018b.

CHOUDHURI, A. et al. Common variants in signaling transcription-factor-binding sites drive phenotypic variability in red blood cell traits. **Nature genetics**, v. 52, n. 12, p. 1333–1345, dez. 2020a.

CHOUDHURI, A. et al. Common variants in signaling transcription-factor-binding sites drive phenotypic variability in red blood cell traits. **Nature genetics**, v. 52, n. 12, p. 1333–1345, dez. 2020b.

CHOUDHURI, A. et al. Common variants in signaling transcription-factor-binding sites drive phenotypic variability in red blood cell traits. **Nature genetics**, v. 52, n. 12, p. 1333–1345, dez. 2020c.

CICATIELLO, L. et al. Transcriptional activation of jun and actin genes by estrogen during mitogenic stimulation of rat uterine cells. **The Journal of steroid biochemistry and molecular biology**, v. 41, n. 3–8, p. 523–8, mar. 1992.

CIOLINO, H. P. et al. Effect of curcumin on the aryl hydrocarbon receptor and cytochrome P450 1A1 in MCF-7 human breast carcinoma cells. **Biochemical pharmacology**, v. 56, n. 2, p. 197–206, 15 jul. 1998.

CIPOLLA, G. A. A non-canonical landscape of the microRNA system. **Frontiers in Genetics**, v. 5, n. SEP, p. 1–6, 2014.

CLERCQ, E. DE; E., D. C. Approved antiviral drugs over the past 50 years. . **Clinical Microbiology Reviews** , v. 29, n. 3, p. 695–747, 2016.

CULLEN, B. R. Viruses and micrnas. **Nature Genetics**, v. 38, n. 6S, p. S25–S30, 2006.

DAMKIER, P. et al. In utero exposure to antibiotics and risk of congenital malformations: a population-based study. **American Journal of Obstetrics and Gynecology**, v. 221, n. 6, p. 648.e1-648.e15, dez. 2019.

DEBAIZE, L. et al. Interplay between transcription regulators RUNX1 and FUBP1 activates an enhancer of the oncogene c-KIT and amplifies cell proliferation. **Nucleic acids research**, v. 46, n. 21, p. 11214–11228, 30 nov. 2018.

DERE, E. et al. Integration of genome-wide computation DRE search, AhR ChIP-chip and gene expression analyses of TCDD-elicited responses in the mouse liver. **BMC genomics**, v. 12, p. 365, 15 jul. 2011.

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

DUFFY, M. R. et al. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715>, p. 2536–2543, 2009.

DUTEIL, D. et al. LSD1 promotes oxidative metabolism of white adipose tissue. **Nature communications**, v. 5, p. 4093, 10 jun. 2014.

DVORÁK, Z. et al. Involvement of cytoskeleton in AhR-dependent CYP1A1 expression. **Current drug metabolism**, v. 7, n. 3, p. 301–13, abr. 2006.

- EGHTEDARI B, C. R. Levothyroxine. Em: **StatPearls**. [s.l: s.n.].
- EKINS, S. et al. Open drug discovery for the Zika virus. **F1000Research**, v. 5, n. 0, p. 150, 2016.
- EMILSSON, V. et al. Hexosamines and nutrient excess induce leptin production and leptin receptor activation in pancreatic islets and clonal beta-cells. **Endocrinology**, v. 142, n. 10, p. 4414–9, out. 2001.
- FAGERBERG, L. et al. Analysis of the Human Tissue-specific Expression by Genome-wide Integration of Transcriptomics and Antibody-based Proteomics. **Molecular & Cellular Proteomics**, v. 13, n. 2, p. 397–406, fev. 2014.
- FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.
- FERRARIS, P.; YSSEL, H.; MISSÉ, D. Zika virus infection: an update. **Microbes and Infection**, v. 21, n. 8–9, p. 353–360, 2019.
- FOWLKES, J. L. et al. Runt-related transcription factor 2 (RUNX2) and RUNX2-related osteogenic genes are down-regulated throughout osteogenesis in type 1 diabetes mellitus. **Endocrinology**, v. 149, n. 4, p. 1697–704, abr. 2008.
- FRIEDLANDER, E. A. et al. The evolution of proton pump inhibitors for the treatment of gastroesophageal reflux disease. **Journal of the American Academy of Nurse Practitioners**, v. 22, n. 12, p. 674–683, dez. 2010.
- GANDHI, R. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor induces human type 1 regulatory T cell-like and Foxp3(+) regulatory T cells. **Nature immunology**, v. 11, n. 9, p. 846–53, set. 2010.
- GASPARINI, R. et al. Do the omeprazole family compounds exert a protective effect against influenza-like illness? **BMC Infectious Diseases**, v. 14, n. 1, p. 297, 2 dez. 2014.
- GEBERT, L. F. R. et al. Miravirsin (SPC3649) can inhibit the biogenesis of miR-122. **Nucleic Acids Research**, v. 42, n. 1, p. 609–621, 2014.
- GHARBARAN, R.; SOMENARAIN, L. Insights into the molecular roles of Zika virus in human reproductive complications and congenital neuropathologies. **Pathology**, v. 49, n. 7, p. 707–714, 2017.
- GIRARDI, E.; LÓPEZ, P.; PFEFFER, S. On the importance of host MicroRNAs during viral infection. **Frontiers in Genetics**, v. 9, n. OCT, p. 1–17, 2018.
- GIULIANI, C.; BUCCI, I.; NAPOLITANO, G. The Role of the Transcription Factor Nuclear Factor-kappa B in Thyroid Autoimmunity and Cancer. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 21 ago. 2018.
- GRANT, C. et al. Dysregulation of TGF-beta signaling and regulatory and effector T-cell function in virus-induced neuroinflammatory disease. **Blood**, v. 111, n. 12, p. 5601–9, 15 jun. 2008.
- GULLAND, A. Zika virus is a global public health emergency, declares WHO. **BMJ (Clinical research ed.)**, v. 352, n. February, p. i657, 2016.
- GUO, H. et al. ONECUT2 is a driver of neuroendocrine prostate cancer. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 278, 17 jan. 2019.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **J Virol**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 2015.

- HAMEL, R. et al. Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. **Microbes and Infection**, v. 18, n. 7–8, p. 441–449, 2016.
- HAN, H. et al. Mesenchymal and stem-like prostate cancer linked to therapy-induced lineage plasticity and metastasis. **Cell reports**, v. 39, n. 1, p. 110595, 5 abr. 2022.
- HANNA, J.; HOSSAIN, G. S.; KOCERHA, J. The potential for microRNA therapeutics and clinical research. **Frontiers in Genetics**, v. 10, n. MAY, 2019.
- HARDY, D. B. et al. Progesterone Receptor Plays a Major Antiinflammatory Role in Human Myometrial Cells by Antagonism of Nuclear Factor- κ B Activation of Cyclooxygenase 2 Expression. **Molecular Endocrinology**, v. 20, n. 11, p. 2724–2733, 1 nov. 2006.
- HEIMAN, A. S. et al. New steroidal anti-inflammatory antedugs bind to macrophage glucocorticoid receptors and inhibit nitric oxide generation. **Steroids**, v. 63, n. 12, p. 644–9, dez. 1998.
- HEMMER, M. C. et al. E47 modulates hepatic glucocorticoid action. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 306, 18 jan. 2019a.
- HEMMER, M. C. et al. E47 modulates hepatic glucocorticoid action. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 306, 18 jan. 2019b.
- HEURTIER, V. et al. The molecular logic of Nanog-induced self-renewal in mouse embryonic stem cells. **Nature communications**, v. 10, n. 1, p. 1109, 7 mar. 2019.
- HOLLENHORST, P. C. et al. DNA specificity determinants associate with distinct transcription factor functions. **PLoS genetics**, v. 5, n. 12, p. e1000778, dez. 2009.
- HOSOKAWA, Y. et al. Synergistic gene expressions of cyclin E, cdk2, cdk5 and E2F-1 during the prolactin-induced G1/S transition in rat Nb2 pre-T lymphoma cells. **Biochemistry and molecular biology international**, v. 37, n. 2, p. 393–9, out. 1995.
- HOXHA, S. et al. YAP-Mediated Recruitment of YY1 and EZH2 Represses Transcription of Key Cell-Cycle Regulators. **Cancer research**, v. 80, n. 12, p. 2512–2522, 15 jun. 2020.
- HUERTA-YEPEZ, S. et al. Involvement of the TNF- α autocrine-paracrine loop, via NF- κ B and YY1, in the regulation of tumor cell resistance to Fas-induced apoptosis. **Clinical immunology (Orlando, Fla.)**, v. 120, n. 3, p. 297–309, set. 2006.
- HUNT, G. C.; SINGH, P.; SCHWARZBAUER, J. E. Endogenous production of fibronectin is required for self-renewal of cultured mouse embryonic stem cells. **Experimental cell research**, v. 318, n. 15, p. 1820–31, 10 set. 2012.
- IVEY-HOYLE, M. et al. Cloning and characterization of E2F-2, a novel protein with the biochemical properties of transcription factor E2F. **Molecular and Cellular Biology**, v. 13, n. 12, p. 7802–7812, dez. 1993.
- JANG, Y. K. et al. Retinoic acid-mediated induction of neurons and glial cells from human umbilical cord-derived hematopoietic stem cells. **Journal of neuroscience research**, v. 75, n. 4, p. 573–84, 15 fev. 2004.
- JIN, U.-H. et al. Omeprazole Inhibits Glioblastoma Cell Invasion and Tumor Growth. **Cancers**, v. 12, n. 8, p. 2097, 28 jul. 2020.

KANG, H. S. et al. GLIS3 is indispensable for TSH/TSHR-dependent thyroid hormone biosynthesis and follicular cell proliferation. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 12, p. 4326–4337, 1 dez. 2017a.

KANG, H. S. et al. GLIS3 is indispensable for TSH/TSHR-dependent thyroid hormone biosynthesis and follicular cell proliferation. **The Journal of clinical investigation**, v. 127, n. 12, p. 4326–4337, 1 dez. 2017b.

KATSIFIS, G. E.; MOUTSOPOULOS, N. M.; WAHL, S. M. T lymphocytes in Sjögren's syndrome: contributors to and regulators of pathophysiology. **Clinical reviews in allergy & immunology**, v. 32, n. 3, p. 252–64, jun. 2007.

KEIGHTLEY, D. D. The binding of progesterone, R-5020 and ORG-2058 to progesterone receptor. **European journal of cancer**, v. 15, n. 5, p. 785–90, maio 1979.

KIDDER, B. L.; YANG, J.; PALMER, S. Stat3 and c-Myc genome-wide promoter occupancy in embryonic stem cells. **PloS one**, v. 3, n. 12, p. e3932, 2008.

KIM, K. S. et al. A quantitative model used to compare within-host SARS-CoV-2, MERS-CoV, and SARS-CoV dynamics provides insights into the pathogenesis and treatment of SARS-CoV-2. **PLOS Biology**, v. 19, n. 3, p. e3001128, 22 mar. 2021.

KIM, Y.-C. et al. Farnesoid X receptor-induced lysine-specific histone demethylase reduces hepatic bile acid levels and protects the liver against bile acid toxicity. **Hepatology (Baltimore, Md.)**, v. 62, n. 1, p. 220–31, jul. 2015.

KIM, Y.-S. GLIS3, a novel member of the GLIS subfamily of Kruppel-like zinc finger proteins with repressor and activation functions. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 19, p. 5513–5525, 1 out. 2003.

KON, A. et al. Cooperation between SMAD and NF- κ B in growth factor regulated type VII collagen gene expression. **Oncogene**, v. 18, n. 10, p. 1837–1844, 11 mar. 1999.

KRENDL, C. et al. GATA2/3-TFAP2A/C transcription factor network couples human pluripotent stem cell differentiation to trophectoderm with repression of pluripotency. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 114, n. 45, p. E9579–E9588, 7 nov. 2017.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 2007.

KYONO, Y. et al. Liganded Thyroid Hormone Receptors Transactivate the DNA Methyltransferase 3a Gene in Mouse Neuronal Cells. **Endocrinology**, v. 157, n. 9, p. 3647–57, set. 2016.

LEE, W. J.; SHIM, J.-Y.; ZHU, B. T. Mechanisms for the inhibition of DNA methyltransferases by tea catechins and bioflavonoids. **Molecular pharmacology**, v. 68, n. 4, p. 1018–30, out. 2005.

LESSLER, J. et al. Assessing the global threat from Zika virus. **Science**, v. 46, n. 24, p. 601–604, 2016.

LI, Q. V et al. Genome-scale screens identify JNK-JUN signaling as a barrier for pluripotency exit and endoderm differentiation. **Nature genetics**, v. 51, n. 6, p. 999–1010, jun. 2019.

LI, Y.; GE, C.; FRANCESCHI, R. T. Role of Runx2 in prostate development and stem cell function. **The Prostate**, v. 81, n. 4, p. 231–241, mar. 2021.

- LIN, B. et al. Integrated expression profiling and ChIP-seq analyses of the growth inhibition response program of the androgen receptor. **PloS one**, v. 4, n. 8, p. e6589, 11 ago. 2009.
- LU, L.; BARBI, J.; PAN, F. The regulation of immune tolerance by FOXP3. **Nature Reviews Immunology**, v. 17, n. 11, p. 703–717, 31 nov. 2017.
- LU, S. et al. TBX2 controls a proproliferative gene expression program in melanoma. **Genes & development**, v. 35, n. 23–24, p. 1657–1677, 1 dez. 2021.
- LYLE PETERSON et al. Zika Virus. **Centers for Disease Control and Prevention: Zika Virus Home**, n. March 2015, 2016.
- LYNCH, C. et al. Identifying environmental chemicals as agonists of the androgen receptor by using a quantitative high-throughput screening platform. **Toxicology**, v. 385, p. 48–58, 15 jun. 2017.
- MAHATA, S. et al. Berberine modulates AP-1 activity to suppress HPV transcription and downstream signaling to induce growth arrest and apoptosis in cervical cancer cells. **Molecular Cancer**, v. 10, n. 1, p. 39, 15 dez. 2011.
- MARLOWE, J. L. et al. The aryl hydrocarbon receptor binds to E2F1 and inhibits E2F1-induced apoptosis. **Molecular biology of the cell**, v. 19, n. 8, p. 3263–71, ago. 2008.
- MASSIE, C. E. et al. New androgen receptor genomic targets show an interaction with the ETS1 transcription factor. **EMBO reports**, v. 8, n. 9, p. 871–8, set. 2007.
- MATIAS, P. M. et al. Structural basis for the glucocorticoid response in a mutant human androgen receptor (AR(ccr)) derived from an androgen-independent prostate cancer. **Journal of medicinal chemistry**, v. 45, n. 7, p. 1439–46, 28 mar. 2002.
- MATSUMOTO, K. et al. mTOR signal and hypoxia-inducible factor-1 alpha regulate CD133 expression in cancer cells. **Cancer research**, v. 69, n. 18, p. 7160–4, 15 set. 2009.
- MAYYA, V. K.; DUCHAINE, T. F. Ciphers and Executioners: How 3'-Untranslated Regions Determine the Fate of Messenger RNAs. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 24 jan. 2019.
- MCARTHUR, M. A. Zika virus: Recent advances towards the development of vaccines and therapeutics. **Viruses**, v. 9, n. 6, 2017.
- MCLEAN, E. et al. Computational identification of mutually homologous Zika virus miRNAs that target microcephaly genes. **Libyan Journal of Medicine**, v. 12, n. 1, 2017.
- MICHAELIS, M. et al. Omeprazole Increases the Efficacy of Acyclovir Against Herpes Simplex Virus Type 1 and 2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 3 dez. 2019a.
- MICHAELIS, M. et al. Omeprazole Increases the Efficacy of Acyclovir Against Herpes Simplex Virus Type 1 and 2. **Frontiers in Microbiology**, v. 10, 3 dez. 2019b.
- MOELLER, L. C. et al. Thyroid hormone responsive genes in cultured human fibroblasts. **The Journal of clinical endocrinology and metabolism**, v. 90, n. 2, p. 936–43, fev. 2005.
- MORRISON, J.; PLOTKIN, S. Viral Vaccines. Em: **Viral Pathogenesis**. [s.l.] Elsevier, 2016. p. 253–269.
- MOSQUERA-SULBARAN, J. A.; HERNÁNDEZ-FONSECA, H. Tetracycline and viruses: a possible treatment for COVID-19? **Archives of Virology**, v. 166, n. 1, p. 1–7, 2 jan. 2021.

- MURAI, M. et al. Interleukin 10 acts on regulatory T cells to maintain expression of the transcription factor Foxp3 and suppressive function in mice with colitis. **Nature immunology**, v. 10, n. 11, p. 1178–84, nov. 2009.
- MURRAY, I. A.; PERDEW, G. H. Omeprazole stimulates the induction of human insulin-like growth factor binding protein-1 through aryl hydrocarbon receptor activation. **The Journal of pharmacology and experimental therapeutics**, v. 324, n. 3, p. 1102–10, mar. 2008.
- MUSSO, D. Zika virus transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 10, p. 1887–1889, 2015.
- NAGAOKA, S. I. et al. ZGLP1 is a determinant for the oogenic fate in mice. **Science (New York, N.Y.)**, v. 367, n. 6482, 6 mar. 2020.
- NAHUM, G. G.; UHL, K.; KENNEDY, D. L. Antibiotic Use in Pregnancy and Lactation. **Obstetrics & Gynecology**, v. 107, n. 5, p. 1120–1138, maio 2006.
- NALDINI, L. et al. Efficient transfer, integration, and sustained long-term expression of the transgene in adult rat brains injected with a lentiviral vector. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 93, n. 21, p. 11382–11388, 1996a.
- NALDINI, L. et al. In Vivo Gene Delivery and Stable Transduction of Nondividing Cells by a Lentiviral Vector. **Science**, v. 272, n. 5259, p. 263 LP – 267, 12 abr. 1996b.
- NASERI-NOSAR, P.; NOGALSKI, M. T.; SHENK, T. The aryl hydrocarbon receptor facilitates the human cytomegalovirus-mediated G1/S block to cell cycle progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 12, 23 mar. 2021a.
- NASERI-NOSAR, P.; NOGALSKI, M. T.; SHENK, T. The aryl hydrocarbon receptor facilitates the human cytomegalovirus-mediated G1/S block to cell cycle progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 118, n. 12, 23 mar. 2021b.
- NEAG, M. A. et al. Berberine: Botanical Occurrence, Traditional Uses, Extraction Methods, and Relevance in Cardiovascular, Metabolic, Hepatic, and Renal Disorders. **Frontiers in Pharmacology**, v. 9, 21 ago. 2018.
- NEUMAN, E. et al. Transcription of the E2F-1 gene is rendered cell cycle dependent by E2F DNA-binding sites within its promoter. **Molecular and cellular biology**, v. 15, n. 8, p. 4660, ago. 1995.
- NICOLAIDES, N. C.; CHARMANDARI, E.; CHROUSOS, G. P. Glucocorticoid receptor. Em: **Encyclopedia of Endocrine Diseases**. [s.l.] Elsevier, 2018. p. 104–111.
- NIKAMI, H.; NEDERGAARD, J.; FREDRIKSSON, J. M. Norepinephrine but not hypoxia stimulates HIF-1 α gene expression in brown adipocytes. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 337, n. 1, p. 121–6, 11 nov. 2005.
- NILSSEN, L. S. et al. G protein-coupled receptor agonist-stimulated expression of ATF3/LRF-1 and c-myc and comitogenic effects in hepatocytes do not require EGF receptor transactivation. **Journal of cellular physiology**, v. 201, n. 3, p. 349–58, dez. 2004.
- NISHIYAMA, A. et al. Uncovering early response of gene regulatory networks in ESCs by systematic induction of transcription factors. **Cell stem cell**, v. 5, n. 4, p. 420–33, 2 out. 2009.
- NUZZI, R. et al. Effect of *In Vitro* Exposure of Corticosteroid Drugs, Conventionally Used in AMD Treatment, on Mesenchymal Stem Cells. **Stem Cells International**, v. 2012, p. 1–11, 2012.

O'BRIEN, J. et al. Overview of MicroRNA Biogenesis, Mechanisms of Actions, and Circulation. **Frontiers in Endocrinology**, v. 9, 3 ago. 2018.

OHANNA, M. et al. Secretome from senescent melanoma engages the STAT3 pathway to favor reprogramming of naive melanoma towards a tumor-initiating cell phenotype. **Oncotarget**, v. 4, n. 12, p. 2212–24, dez. 2013.

OJASOO, T. et al. Binding of steroids to the progesterone and glucocorticoid receptors analyzed by correspondence analysis. **Journal of medicinal chemistry**, v. 31, n. 6, p. 1160–9, jun. 1988.

PAIXÃO, E. S. et al. Symptomatic dengue during pregnancy and congenital neurologic malformations. **Emerging Infectious Diseases**, v. 24, n. 9, p. 1748–1750, 2018.

PÁLMER, H. G. et al. Genetic signatures of differentiation induced by 1 α ,25-dihydroxyvitamin D3 in human colon cancer cells. **Cancer research**, v. 63, n. 22, p. 7799–806, 15 nov. 2003.

PHILLIPS, C. B.; TSAI, C.-W.; TSAI, M.-F. The conserved aspartate ring of MCU mediates MICU1 binding and regulation in the mitochondrial calcium uniporter complex. **eLife**, v. 8, 15 jan. 2019.

PHUC LE, P. et al. Glucocorticoid receptor-dependent gene regulatory networks. **PLoS genetics**, v. 1, n. 2, p. e16, ago. 2005.

PLATT, D. J. et al. Zika virus-related neurotropic flaviviruses infect human placental explants and cause fetal demise in mice. **Science Translational Medicine**, v. 10, n. 426, p. 1–11, 2018.

POLAND, G. A.; OVSYANNIKOVA, I. G.; KENNEDY, R. B. Zika Vaccine Development: Current Status. **Mayo Clinic Proceedings**, v. 94, n. 12, p. 2572–2586, 2019.

QUILLET, A. et al. Improving Bioinformatics Prediction of microRNA Targets by Ranks Aggregation. **Frontiers in Genetics**, v. 10, 28 jan. 2020.

QUINTANA, F. J. et al. Control of T(reg) and T(H)17 cell differentiation by the aryl hydrocarbon receptor. **Nature**, v. 453, n. 7191, p. 65–71, 1 maio 2008.

RABAAN, A. A. et al. Overview of Zika infection , epidemiology , transmission and control measures. **Journal of Infection and Public Health**, v. 10, n. 2, p. 141–149, 2017.

RATANAKOMOL, T. et al. Berberine Inhibits Dengue Virus through Dual Mechanisms. **Molecules**, v. 26, n. 18, p. 5501, 10 set. 2021.

RICHER, J. K. et al. Differential gene regulation by the two progesterone receptor isoforms in human breast cancer cells. **The Journal of biological chemistry**, v. 277, n. 7, p. 5209–18, 15 fev. 2002.

ROBINSON, C. L. et al. Male germ cells support long-term propagation of Zika virus. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 2090, 29 dez. 2018.

RONDANELLI, M. et al. Polycystic ovary syndrome management: a review of the possible amazing role of berberine. **Archives of Gynecology and Obstetrics**, v. 301, n. 1, p. 53–60, 14 jan. 2020.

ROSENBERGER, C. M. et al. miR-144 attenuates the host response to influenza virus by targeting the TRAF6-IRF7 signaling axis. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 4, p. 1–20, 2017.

ROSS, S. H.; CANTRELL, D. A. Signaling and Function of Interleukin-2 in T Lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 411–433, 26 abr. 2018.

ROTH, A. et al. Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and zika virus infections ??? An unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012???2014. **Eurosurveillance**, v. 19, n. 41, 2014.

ROTHAN, H. A. et al. Study the antiviral activity of some derivatives of tetracycline and non-steroid anti inflammatory drugs towards dengue virus. **Tropical biomedicine**, v. 30, n. 4, p. 681–90, dez. 2013.

ROTHAN, H. A. et al. Inhibitory effect of doxycycline against dengue virus replication in vitro. **Archives of Virology**, v. 159, n. 4, p. 711–718, 19 abr. 2014.

ROUSSEAU, G. G.; SCHMIT, J. P. Structure-activity relationships for glucocorticoids-I. Determination of receptor binding and biological activity. **Journal of steroid biochemistry**, v. 8, n. 9, p. 911–9, set. 1977.

RUBEL, C. A. et al. Research resource: Genome-wide profiling of progesterone receptor binding in the mouse uterus. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 26, n. 8, p. 1428–42, ago. 2012.

RUPAIMOOLE, R.; SLACK, F. J. MicroRNA therapeutics: Towards a new era for the management of cancer and other diseases. **Nature Reviews Drug Discovery**, v. 16, n. 3, p. 203–221, 2017.

SANTIAGO, F. S. et al. Induction of the transcriptional repressor Yin Yang-1 by vascular cell injury. Autocrine/paracrine role of endogenous fibroblast growth factor-2. **The Journal of biological chemistry**, v. 276, n. 44, p. 41143–9, 2 nov. 2001.

SCHEEL, T. K. H. et al. A Broad RNA Virus Survey Reveals Both miRNA Dependence and Functional Sequestration. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 3, p. 409–423, 2016.

SCHUETZ, A. et al. Structural Basis of Inhibition of the Human NAD⁺-Dependent Deacetylase SIRT5 by Suramin. **Structure**, v. 15, n. 3, p. 377–389, mar. 2007.

SCHULT, P. et al. MicroRNA-122 amplifies hepatitis C virus translation by shaping the structure of the internal ribosomal entry site. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018.

SHI, J.-Y. et al. FOXP3 Is a HCC suppressor gene and Acts through regulating the TGF- β /Smad2/3 signaling pathway. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 648, 13 set. 2017a.

SHI, J.-Y. et al. FOXP3 Is a HCC suppressor gene and Acts through regulating the TGF- β /Smad2/3 signaling pathway. **BMC cancer**, v. 17, n. 1, p. 648, 13 set. 2017b.

SLONCHAK, A. et al. Human MicroRNA miR-532-5p Exhibits Antiviral Activity against West Nile Virus via Suppression of Host Genes SESTD1 and TAB3 Required for Virus Replication. **Journal of Virology**, v. 90, n. 5, p. 2388–2402, 2016.

SMITH, J. L. et al. crossm A MicroRNA Screen Identifies the Wnt Signaling Pathway as a Regulator of the Interferon Response during Flavivirus Infection. v. 91, n. 8, p. 1–15, 2017.

SOLANO, M. E.; ARCK, P. C. Steroids, Pregnancy and Fetal Development. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 22 jan. 2020.

SON, Y.-O. et al. Estrogen-related receptor γ causes osteoarthritis by upregulating extracellular matrix-degrading enzymes. **Nature communications**, v. 8, n. 1, p. 2133, 15 dez. 2017.

SONG, S. et al. Downregulation of Cellular c-Jun N-Terminal Protein Kinase and NF- κ B Activation by Berberine May Result in Inhibition of Herpes Simplex Virus Replication. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 9, p. 5068–5078, set. 2014.

- STEFANSKA, B. et al. Transcription onset of genes critical in liver carcinogenesis is epigenetically regulated by methylated DNA-binding protein MBD2. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 12, p. 2738–49, dez. 2013.
- STRAUSS, B. E. et al. A lentiviral vector with expression controlled by E2F-1: A potential tool for the study and treatment of proliferative diseases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, n. 4, p. 1411–1418, 2006.
- STRUB, T. et al. SIRT6 haploinsufficiency induces BRAFV600E melanoma cell resistance to MAPK inhibitors via IGF signalling. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 3440, 24 ago. 2018.
- SUN, J. et al. Elaboration of tetravalent antibody responses against dengue viruses using a subunit vaccine comprised of a single consensus dengue envelope sequence. **Vaccine**, v. 35, n. 46, p. 6308–6320, 2017.
- ŚWIERCZEK-LASEK, B. et al. Interleukin 4 Moderately Affects Competence of Pluripotent Stem Cells for Myogenic Conversion. **International journal of molecular sciences**, v. 20, n. 16, 13 ago. 2019.
- TAGUWA, S. et al. Zika Virus Dependence on Host Hsp70 Provides a Protective Strategy against Infection and Disease. **Cell Reports**, v. 26, n. 4, p. 906–920.e3, 2019.
- TANENBAUM, M. E. et al. A complex of Kif18b and MCAK promotes microtubule depolymerization and is negatively regulated by Aurora kinases. **Current biology : CB**, v. 21, n. 16, p. 1356–65, 23 ago. 2011.
- TANG, Y.-A. et al. Hypoxic tumor microenvironment activates GLI2 via HIF-1 α and TGF- β 2 to promote chemoresistance in colorectal cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 115, n. 26, p. E5990–E5999, 26 jun. 2018.
- TAUB, R. et al. Insulin as a growth factor in rat hepatoma cells. Stimulation of proto-oncogene expression. **The Journal of biological chemistry**, v. 262, n. 22, p. 10893–7, 5 ago. 1987.
- TERME, J.-M. et al. Cross talk between expression of the human T-cell leukemia virus type 1 Tax transactivator and the oncogenic bHLH transcription factor TAL1. **Journal of virology**, v. 82, n. 16, p. 7913–22, ago. 2008.
- THE RECOVERY COLLABORATIVE GROUP*. Dexamethasone in Hospitalized Patients with Covid-19. **New England Journal of Medicine**, v. 384, n. 8, p. 693–704, 25 fev. 2021.
- TIMMERMANS, S.; SOUFFRIAU, J.; LIBERT, C. **A general introduction to glucocorticoid biology. Frontiers in Immunology**Frontiers Media S.A., , 2019.
- TROBAUGH, D. W. et al. RNA viruses can hijack vertebrate microRNAs to suppress innate immunity. **Nature**, v. 506, n. 7487, p. 245–248, 2014.
- VALENCIA, X. et al. TNF downmodulates the function of human CD4+CD25hi T-regulatory cells. **Blood**, v. 108, n. 1, p. 253–61, 1 jul. 2006.
- VAN DER LINDEN, V. et al. Description of 13 infants born during October 2015–January 2016 with congenital zika virus infection without microcephaly at birth — Brazil. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 65, n. 47, p. 1343–1348, 2016.
- VAN METER, E. N.; ONYANGO, J. A.; TESKE, K. A. A review of currently identified small molecule modulators of microRNA function. **European Journal of Medicinal Chemistry**, v. 188, 2020.

- VAN WAVEREN, C.; MORAES, C. T. Transcriptional co-expression and co-regulation of genes coding for components of the oxidative phosphorylation system. **BMC genomics**, v. 9, p. 18, 14 jan. 2008.
- VANDEWALLE, J.; LIBERT, C. Glucocorticoids in Sepsis: To Be or Not to Be. **Frontiers in Immunology**, v. 11, 21 jul. 2020.
- VARGHESE, F. S. et al. The Antiviral Alkaloid Berberine Reduces Chikungunya Virus-Induced Mitogen-Activated Protein Kinase Signaling. **Journal of Virology**, v. 90, n. 21, p. 9743–9757, nov. 2016.
- VARKONYI-GASIC, E.; HELLENS, R. P. Quantitative Stem-Loop RT-PCR for Detection of MicroRNAs. *Em: [s.l.: s.n.]*. p. 145–157.
- VERNIER, M. et al. Estrogen-related receptors are targetable ROS sensors. **Genes & development**, v. 34, n. 7–8, p. 544–559, 1 abr. 2020a.
- VERNIER, M. et al. Estrogen-related receptors are targetable ROS sensors. **Genes & development**, v. 34, n. 7–8, p. 544–559, 1 abr. 2020b.
- VIERECK, V. et al. Differential regulation of Cbfa1/Runx2 and osteocalcin gene expression by vitamin-D3, dexamethasone, and local growth factors in primary human osteoblasts. **Journal of cellular biochemistry**, v. 86, n. 2, p. 348–56, 2002.
- VRZAL, R. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor by berberine in HepG2 and H4IIE cells: Biphasic effect on CYP1A1. **Biochemical pharmacology**, v. 70, n. 6, p. 925–36, 15 set. 2005.
- WANG, T. et al. Nicotine induced CpG methylation of Pax6 binding motif in StAR promoter reduces the gene expression and cortisol production. **Toxicology and applied pharmacology**, v. 257, n. 3, p. 328–37, 15 dez. 2011.
- WANG, X. et al. SOX17 regulates uterine epithelial-stromal cross-talk acting via a distal enhancer upstream of Ihh. **Nature communications**, v. 9, n. 1, p. 4421, 24 out. 2018.
- WEI, J. et al. Antagonistic nature of T helper 1/2 developmental programs in opposing peripheral induction of Foxp3+ regulatory T cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 46, p. 18169–74, 13 nov. 2007.
- WEISZ, A.; BRESCIANI, F. Estrogen induces expression of c-fos and c-myc protooncogenes in rat uterus. **Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)**, v. 2, n. 9, p. 816–24, set. 1988.
- WHIRLEDGE, S. D. et al. Uterine glucocorticoid receptors are critical for fertility in mice through control of embryo implantation and decidualization. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 49, p. 15166–71, 8 dez. 2015.
- WHO. Zika Epidemiology Update. **Who**, n. July, p. 1–14, 2019a.
- WHO. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. **World Health Organization**, n. July, p. 2019, 2019b.
- WILKENS, J.; CRITCHLEY, H. Progesterone receptor modulators in gynaecological practice. **The journal of family planning and reproductive health care**, v. 36, n. 2, p. 87–92, abr. 2010.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION(WHO). WHO / UNICEF Zika Virus Vaccine Target Product Profile for Emergency / Outbreak Use WHO / UNICEF Zika Virus Vaccine Target Product Profile for Emergency / Outbreak Use. n. November 2016, p. 1–17, 2017.

WORMSER, G. P. et al. How safe is doxycycline for young children or for pregnant or breastfeeding women? **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 93, n. 3, p. 238–242, mar. 2019.

XU, R.-H. et al. NANOG is a direct target of TGFbeta/activin-mediated SMAD signaling in human ESCs. **Cell stem cell**, v. 3, n. 2, p. 196–206, 7 ago. 2008.

YASUDA, K. et al. A comprehensive in vitro and in silico analysis of antibiotics that activate pregnane X receptor and induce CYP3A4 in liver and intestine. **Drug metabolism and disposition: the biological fate of chemicals**, v. 36, n. 8, p. 1689–97, ago. 2008.

YE, M. et al. Linc011105 acts as an oncogene in the development of neuroblastoma. **Oncology reports**, v. 42, n. 4, p. 1527–1538, out. 2019.

ZEDDOU, M. et al. Differential signalling through ALK-1 and ALK-5 regulates leptin expression in mesenchymal stem cells. **Stem cells and development**, v. 21, n. 11, p. 1948–55, 20 jul. 2012.

ZHANG, S.; QIN, C.; SAFE, S. H. Flavonoids as aryl hydrocarbon receptor agonists/antagonists: effects of structure and cell context. **Environmental health perspectives**, v. 111, n. 16, p. 1877–82, dez. 2003.

ZHANG, X. et al. Pax6 is a human neuroectoderm cell fate determinant. **Cell stem cell**, v. 7, n. 1, p. 90–100, 2 jul. 2010.

ZHAO, Q. et al. The Role and Therapeutic Perspectives of Sirtuin 3 in Cancer Metabolism Reprogramming, Metastasis, and Chemoresistance. **Frontiers in oncology**, v. 12, p. 910963, 2022.

ZHAO, S. et al. Activation of the aryl hydrocarbon receptor represses mammosphere formation in MCF-7 cells. **Cancer letters**, v. 317, n. 2, p. 192–8, 28 abr. 2012.

ZHOU, L. AHR Function in Lymphocytes: Emerging Concepts. **Trends in Immunology**, v. 37, n. 1, p. 17–31, jan. 2016.

ZORN, E. et al. IL-2 regulates FOXP3 expression in human CD4+CD25+ regulatory T cells through a STAT-dependent mechanism and induces the expansion of these cells in vivo. **Blood**, v. 108, n. 5, p. 1571–9, 1 set. 2006.

ANEXO 1 -Material complementar

Tabela 3 - Candidatos de miRNA que apresentam interação com o genoma do vírus da Zika obtidos a partir do algoritmo PITA

NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-4786-3p	MIMAT0019955	Homo	sapiens	16	-2595
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3147	MIMAT0015019	Homo	sapiens	13	-2497
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7110-3p	MIMAT0028118	Homo	sapiens	71	-2401
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4787-5p	MIMAT0019956	Homo	sapiens	13	-2363
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4632-5p	MIMAT0022977	Homo	sapiens	29	-2362
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6783-3p	MIMAT0027467	Homo	sapiens	33	-2343
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-939-3p	MIMAT0022939	Homo	sapiens	21	-2333
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1226-5p	MIMAT0005576	Homo	sapiens	22	-2259
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-638	MIMAT0003308	Homo	sapiens	17	-2256
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-5088-3p	MIMAT0027041	Homo	sapiens	53	-2251
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3127-3p	MIMAT0019201	Homo	sapiens	34	-2245
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7974	MIMAT0031177	Homo	sapiens	27	-2240
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3184-5p	MIMAT0015064	Homo	sapiens	9	-2233
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4763-3p	MIMAT0019913	Homo	sapiens	14	-2233
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4722-5p	MIMAT0019836	Homo	sapiens	13	-2198
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6089	MIMAT0023714	Homo	sapiens	11	-2197
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7111-3p	MIMAT0028120	Homo	sapiens	57	-2194
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4659b-3p	MIMAT0019734	Homo	sapiens	71	-2187
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3189-5p	MIMAT0019217	Homo	sapiens	29	-2180
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6715b-3p	MIMAT0025843	Homo	sapiens	14	-2169
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1909-5p	MIMAT0007882	Homo	sapiens	7	-2164
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7703	MIMAT0030018	Homo	sapiens	24	-2144
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6833-3p	MIMAT0027567	Homo	sapiens	57	-2132
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6752-5p	MIMAT0027404	Homo	sapiens	21	-2131
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-762	MIMAT0010313	Homo	sapiens	19	-2126
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7161-3p	MIMAT0028233	Homo	sapiens	22	-2121
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6749-5p	MIMAT0027398	Homo	sapiens	11	-2105
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6740-3p	MIMAT0027382	Homo	sapiens	61	-2097
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6789-5p	MIMAT0027478	Homo	sapiens	11	-2095
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1238-5p	MIMAT0022947	Homo	sapiens	19	-2087

NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3197	MIMAT0015082	Homo	sapiens	8	-2078
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6858-5p	MIMAT0027616	Homo	sapiens	23	-2074
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-942-5p	MIMAT0004985	Homo	sapiens	59	-2067
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3180-5p	MIMAT0015057	Homo	sapiens	40	-2066
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4691-5p	MIMAT0019781	Homo	sapiens	46	-2063
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6881-3p	MIMAT0027663	Homo	sapiens	67	-2060
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-593-5p	MIMAT0003261	Homo	sapiens	16	-2058
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3138	MIMAT0015006	Homo	sapiens	19	-2056
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-33b-3p	MIMAT0004811	Homo	sapiens	19	-2056
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4726-3p	MIMAT0019846	Homo	sapiens	35	-2049
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7847-3p	MIMAT0030422	Homo	sapiens	18	-2043
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4479	MIMAT0019011	Homo	sapiens	15	-2039
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4685-3p	MIMAT0019772	Homo	sapiens	51	-2038
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-485-5p	MIMAT0002175	Homo	sapiens	11	-2025
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6850-5p	MIMAT0027600	Homo	sapiens	9	-2024
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6830-3p	MIMAT0027561	Homo	sapiens	45	-2023
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4739	MIMAT0019868	Homo	sapiens	15	-2020
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1301-3p	MIMAT0005797	Homo	sapiens	23	-2019
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-939-5p	MIMAT0004982	Homo	sapiens	20	-2015
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1227-3p	MIMAT0005580	Homo	sapiens	27	-2012
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1343-5p	MIMAT0027038	Homo	sapiens	11	-2005
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4446-3p	MIMAT0018965	Homo	sapiens	19	-2005
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6855-5p	MIMAT0027610	Homo	sapiens	30	-2001
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3677-3p	MIMAT0018101	Homo	sapiens	11	-1999
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-5194	MIMAT0021125	Homo	sapiens	19	-1991
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6787-5p	MIMAT0027474	Homo	sapiens	14	-1990
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4640-5p	MIMAT0019699	Homo	sapiens	23	-1989
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6769b-5p	MIMAT0027620	Homo	sapiens	25	-1989
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4449	MIMAT0018968	Homo	sapiens	17	-1988
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4741	MIMAT0019871	Homo	sapiens	26	-1985
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-3616-3p	MIMAT0017996	Homo	sapiens	18	-1983
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1914-3p	MIMAT0007890	Homo	sapiens	17	-1981
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-423-3p	MIMAT0001340	Homo	sapiens	17	-1977

NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-623	MIMAT0003292	Homo	sapiens	30	-1977
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1263	MIMAT0005915	Homo	sapiens	16	-1975
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6839-3p	MIMAT0027581	Homo	sapiens	34	-1974
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4723-3p	MIMAT0019839	Homo	sapiens	37	-1973
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-320a	MIMAT0000510	Homo	sapiens	13	-1971
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6812-5p	MIMAT0027524	Homo	sapiens	15	-1971
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4669	MIMAT0019749	Homo	sapiens	20	-1966
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-320b	MIMAT0005792	Homo	sapiens	13	-1960
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-486-3p	MIMAT0004762	Homo	sapiens	24	-1955
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6845-3p	MIMAT0027591	Homo	sapiens	67	-1955
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6743-3p	MIMAT0027388	Homo	sapiens	21	-1950
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-1244	MIMAT0005896	Homo	sapiens	9	-1943
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-6764-3p	MIMAT0027429	Homo	sapiens	34	-1941
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7845-5p	MIMAT0030420	Homo	sapiens	8	-1941
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-4488	MIMAT0019022	Homo	sapiens	15	-1940
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-8089	MIMAT0031016	Homo	sapiens	23	-1940
NC_012532	10794	bp	RNA	linear	VRL	hsa-mir-7158-5p	MIMAT0028226	Homo	sapiens	12	-1934

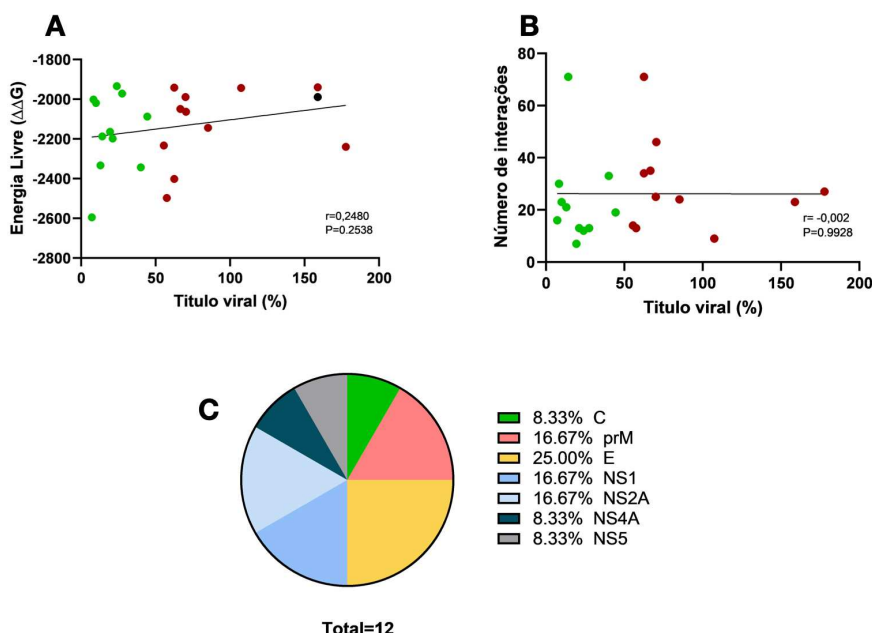


Figura Suplementar 1- Correlação dos resultados entre as informações geradas pela algoritmo PITA e os estudos in vitro das células que apresentam superexpressão dos candidatos de miRNA . (A) Gráfico de dispersão demonstrando a correlação entre o valor de energia livre gerado pelo algoritmo para cada candidato de miRNA e o título viral observado após a infecção das linhagens que expressavam esses candidatos de miRNA. Os pontos verdes representam os candidatos que

apresentaram redução significativa do título viral nos experimentos in vitro, enquanto que os pontos vermelhos representam os candidatos que não demonstraram redução significativa dos valores dos títulos virais. (B) Gráfico de dispersão demonstrando a correlação entre o número de interações possíveis no genoma viral analisado no algoritmo PITA para cada candidato de miRNA e o título viral observado após a infecção das linhagens que expressavam esses candidatos de miRNA. Os pontos verdes representam os candidatos que apresentaram redução significativa do título viral nos experimentos in vitro, enquanto que os pontos vermelhos representam os candidatos que não demonstraram redução significativa dos valores dos títulos virais. (C) Gráfico comparativo entre as regiões codificantes do genoma do ZIKV e a quantidade de candidatos de miRNA que apresentaram melhor efeito antiviral.

Tabela 4 - Sequência de primers para confirmação de perfil gênico do ZIKV linhagem KU729217

	Região genômica	Primers
	Proteína E	Forward: CATTACCAAGATCCCGGCT Reverse: GTGATTACGGGGTTAGCGGT
	Proteína NS1	Forward: AATGCCAGGCACTAAGGTC Reverse: CAGCCATCTTTAGCCCGGAA

Tabela 5 - Sequência de primers dos candidatos de miRNA que foram clonados em vetor FUGW para geração dos lentivírus recombinantes.

Candidato	Região genômica	Primers
hsa-miR-7974	Proteína E	7974-F: GCGAATTCCAGTCCCTCTTTATGGAGCA 7974-R: GCGAATTCAAACGAAGCCTGGAAAGGCA
hsa-miR-6769b	Proteína E	6769b-F: CGAATTCTGCACTGGAAAGGAACGATGG 6769b-R: GAATCCCAAAGGCATTCTCAGGGCT
hsa-miR-320a	Proteína E	320a-F: GAATTCGGGACTGGGCCACAGTATTT 320a-R: TGAATTCGAATCCTCACATTGCGGC
hsa-miR-4722-5p	Proteína C	4722-F: GAATTCAAGGGAGGCACTGTGGAGTA 4722-R: GAATTCAGGGAGAAGATCGTTGAGGC
hsa-miR-6839-3p	Proteína C	6839-F: CCGAATTCGCTCTTCACTTAGCCATGATGC 6839-R: GAATTCAGGGGTTAAGGGACACGACT
hsa-miR-7703	prM	7703-F: GAATTCTGGTGCATGAGCGAGATGAG 7703-R: TGAATTCGCCAGAAGGGAATCCACA
hsa-miR-1301-3p	prM	1301-F: GGAATTCCAAACAGCCTTTCCACTGACG 1301-R: GAATTCGCGTTGTATCTTGCTGCC
hsa-miR-939-5p	prM	939-F: TGAATTCGGAGGAAAGCAAGACGCTGAG 939-R: ATGAATTCAGCACTCACCTTCGGGCAG

hsa-miR-1238-5p	NS1	1238-F: CCGAATTCAAACCGCGACACTCACTGTA 1238-R: CGAATTCCTCCAGCTTTCCTCTTGCTCA
hsa-miR-6764-3p	NS1	6764-F: GAATTCCTCCTTGGGTTTTCGGGGTT 6764-R: GAATTCTACAACCATCGAAGGGGCAC
hsa-miR-6855-5p	NS1	6855-F: GAATTCGGGTGCTCCCTGCTTTTAT 6855-R: TGAATTCATGTCGCCCAGTAGTGGA
hsa-miR-6783-3p	NS2A	6783-F: TTGAATTCGGGGTCCCTCACAAAAGT 6783-R: TGAATTCACCCATGACCTCACCTGGAAG
hsa-miR-4659b-3p	NS2A	4659b-F: GAATTCCTGCAGAGAAGTAAGGCA 4659b-R: GGAATTCCTCTGGAAAGAGTGCACCCAA
hsa-miR-4640-5p	NS2A	4640-F: GAATTCGGATGGAACATCAGAGCTGC 4640-R: TTGAATTCAGAGCTCTACCCGCAGACAG
hsa-miR-7110-3p	NS2B	7110-F: GAATTCCTGAGGGTTTCTCACTTGC 7110-R: CGAATTCAGTCTTTCATGGTCTCCCTCC
hsa-miR-4691-5p	NS2B	4691-F: GAATTCCTCCAGTGTCTGTGACTCG 4691-R: GAATTCCTGTCTGTGGACAGCACTC
hsa-miR-3138	NS2B	3138-F: GAATTCCTGTGAGCTGTGTGAGTACCG 3138-R: GAATTCCTCCTGACCTGCTACCTCT
hsa-miR-3180-5p	NS3	3180-F: TTGAATTCGCGGGAGAAGGATCAGAGTG 3180-R: TAGAATTCGATGAGGGACTGGCATCCG
hsa-miR-6830-3p	NS3	6830-F: GAATTCAGTTGCGAGATAGAGCCCC 6830-R: GAATTCACCCTGGATGGCTTCCTTGT
hsa-miR-1227-3p	NS3	1227-F: GGGAAATCTTCCATCCCCAGGCTTCATT 1227-R: TTGAATTCCTCGTCACCTCCGATTTC
hsa-miR-4776-3p	NS4A	4776-F: GGAATTCGTGCCCTGTTTCAGTTAGGA 4776-R: GGAATTCGCATCCCCTTCTACCTTCTG
hsa-miR-8089	NS4A	8089-F: GAATTCGGTTGTGACACAGGTCTGCT 8089-R: CGAATTCCTCATGATGGGAATCACACGG
hsa-miR-7158-5p	NS4A	7158-F: CGAATTCGACAAAGCTGTGTTCCACCAG 7158-R: CGAATTCCTGGGATGGTTGTATCCTGGC
hsa-miR-6749-5p	NS4B	6749-F: CCGAATTCACGTAATGAGCACAGGCGA 6749-R: TGAATTCACCTATAGGAGAGAGGCCA
hsa-miR-1244	NS4B	1244-F: TTGAATTCGGAGCGTTCTCTGTCCTAC 1244-R: TAGAATTCCTCCTATCCTTGTGCCCTGG
hsa-miR-4763-3P	NS5	4763-F: TTGAATTCCTGAAGGCAGACAGTGGCTC 4763-R: TTGAATTCCTCAGGGAAGGCAGTAGGT

hsa-miR-1909-5p	NS5	1909-F: TTGAATCCCACGTGCGCTGATCTCT 1909-R: GAATTCTCTTGGCGTCTTCTCGAACC
hsa-miR-4726-3p	NS5	4726-F: GGAATTCCAGGAGAGTCTGTCTTCCATGT 4726-R: CGAATTCGGGGAGAAAGGTGACTGTTAG

Tabela 6 - Sequência de primers dos candidatos de miRNA utilizados nos experimentos de q-PCR.

Candidato	Primers para Q-PCR
Primer Rp	GTCGTATCCAGTGCAGGGT
hsa-miR-4786-3p	RT-hsa-mir-4786-3p: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACGCCAG Fp- hsa-mir-4786-3p: AACAAGTGAAGCCAGCTCTG
hsa-miR-4659b-3p	RT- hsa-miR-4659b-3p : GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACAGCTGC Fp- hsa-miR-4659b-3p: AGCCAGCGTTTCTTCTTAGACA
hsa-miR-4722-5p	RT- hsa-miR-4722-5p : GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACCAACCT Fp- hsa-miR-4722-5p: AAGAATGGCAGGAGGGCTG
hsa-miR-939-3p	RT-hsa-miR-939-3p: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACCTGGGG Fp- hsa-miR-939-3p: AACAATCCCTGGGCCTCTG
hsa-miR-6783-3p	RT-hsa-mir-6783-3p: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACCTACAG Fp- hsa-mir-6783-3p: AACAGTGTTCCTGGGCTTCT
hsa-miR-1301-3p	RT- hsa-miR-1301-3p : GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACGAAGTC Fp- has-miR-1301-3p: AACAAGTTGCAGCTGCCTG
hsa-miR-1909-5p	RT-hsa-miR-1909-5p: GTCGTATCCAGTGCAGGGTCCGAGGTATTGCACTGGATACGACCAGGGC Fp- hsa-miR-1909-5p: AACAATTGAGTGCCGGTGC