



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS DA SAÚDE**

CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE
DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS**

**ARACAJU
2019**

CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE
DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Orientadora: Prof.^a Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus

**ARACAJU
2019**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA BISAU
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237p Santos, Camilla Natália Oliveira
Polimorfismos genéticos associados à ocorrência e gravidade da síndrome congênita do Zika vírus / Camilla Natália Oliveira Santos; orientadora Amélia Maria Ribeiro de Jesus. – Aracaju, 2019.
62 f.

Dissertação (mestrado em Ciências da Saúde) – Universidade Federal de Sergipe, 2019.

1. Infecção. 2. Microcefalia. 3. Polimorfismo genético. 4. Zika vírus. I. Jesus, Amélia Maria Ribeiro de orient. II. Título.

CDU 61

CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS

**POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE
DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal de Sergipe como requisito parcial à obtenção do grau de Mestre em Ciências da Saúde.

Aprovada em: ____/____/____

Orientador: Prof^ª. Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus
Universidade Federal de Sergipe

1º Examinador: Prof. Dr. Márcio Bezerra Santos
Universidade Federal de Sergipe

2º Examinador: Prof^ª. Dra. Nalu Teixeira de Aguiar Peres
Universidade Federal de Sergipe

AGRADECIMENTOS

À Universidade Federal de Sergipe, ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e às agências de fomento, CAPES e FINEP, que tornaram possível a realização deste estudo;

À minha orientadora, Prof.^a Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus, por quem tenho profunda admiração. Agradeço por toda gentileza, ajuda e ensinamentos disponibilizados a mim durante todo o mestrado, que contribuíram imensuravelmente para minha formação;

Ao Prof. Roque Pacheco de Almeida, pelos ensinamentos, por me conceder a oportunidade de trabalhar junto a seu grupo e possibilitar a realização deste trabalho;

A todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular, em especial a Dra. Nalu Peres, Dr. Rodrigo Cazzaniga e Dra. Tatiana Moura, pelo ensino e contribuições para a realização deste trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia e Biologia molecular, em especial a Aline Barreto, Danielle Ribeiro, Juliana Cardoso, Lays Bomfim, Lucas Magalhães e Marcello Anchieta, pelo convívio diário, companhia e disponibilidade em compartilhar seus aprendizados;

À equipe do ambulatório de microcefalia: Dra. Adriana Fonseca, Dra. Ana Jovina Bispo, Dra. Roseane Porto;

Aos pesquisadores e estudantes do Laboratório de Imunofarmacologia, UFMG.

À minha família, por me apoiar, entender, incentivar e acreditar diariamente nas minhas escolhas.

Muito obrigada!

RESUMO

POLIMORFISMOS GENÉTICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE DA SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA VÍRUS. SANTOS, C. N. O. Aracaju, 2019.

A infecção pelo vírus Zika (ZIKV) varia de assintomática a grave e pode levar a distúrbios neurológicos, a exemplo da microcefalia. A resposta imune (RI) desenvolvida durante a infecção por ZIKV ainda não está completamente elucidada e existem dificuldades em saber se os produtos da RI detectados durante ou após a infecção atuam como causa ou consequência desta. Além disso, os fatores determinantes para o acometimento pelas formas mais graves associadas à infecção ainda não estão claros. A infecção pelo ZIKV, a exemplo de outras doenças infecciosas, tem caráter multifatorial, no qual a susceptibilidade ou resistência e o comportamento clínico são influenciados por fatores ambientais e genéticos do hospedeiro, com herança multigênica. Determinantes genéticos como os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), que são sítios no genoma onde variantes de um nucleotídeo são comuns na população, podem atuar modulando a RI e contribuir para o curso dos diferentes desfechos clínicos. O presente trabalho avaliou a associação de SNPs nos genes CD209, TNF α , CXCL8, IL-4, IL-6, CCL-2, TLR3, TLR4 e MICB com a infecção por ZIKV por meio de um estudo caso-controle, no qual o grupo caso foi composto por crianças com microcefalia associada à infecção por ZIKV e o grupo controle, composto por crianças saudáveis que nasceram no mesmo período do surto de ZIKV. Além disso, comparamos também os pais das crianças com microcefalia com mães controles que tiveram crianças saudáveis no mesmo período do surto de ZIKV, residentes em áreas endêmicas à infecção por ZIKV. DNA genômico de pacientes e controles foram obtidos e utilizados na genotipagem dos SNPs funcionais nos genes candidatos e a associação com a infecção por ZIKV foi verificada através do teste Qui-quadrado ou Teste Exato de Fisher. Neste estudo, foi encontrada associação entre a presença do alelo T no SNP rs3775291 no gene TLR3 com a ocorrência de microcefalia decorrente da Síndrome Congênita do ZIKV. Este alelo foi mais frequente nas mães do grupo caso quando comparadas às mães do grupo controle. Encontramos também associação do SNP rs1799964 no gene TNF α com a microcefalia grave, onde o alelo T foi mais frequente nas crianças com microcefalia grave, do que nas crianças com microcefalia ao nascimento. Em conclusão, este trabalho traz pela primeira vez uma associação entre a variante associada com um possível efeito deletério na estrutura da proteína do TLR3, que pode levar a uma menor ativação das vias desencadeadas pelo TLR3, nas mães que tiveram crianças com microcefalia, sugerindo que a diminuição da ativação desta via inflamatória seja um fator importante na indução das lesões neurológicas no feto. Além disso, a variante T do SNP no TNF α , associado a baixa produção desta citocina, foi mais frequente nas crianças com microcefalia mais grave ao nascimento, sendo possível que a defesa antiviral menor no feto, predisponha à invasão do SNC pelo ZIKV. Esses dados dão subsídios para um melhor entendimento acerca dos mecanismos imunológicos, influenciados por fatores genéticos que predisõem a diferentes desfechos frente a infecções pelo ZIKV.

Descritores: Infecção. Microcefalia. Polimorfismos genéticos. ZIKV.

ABSTRACT

GENÉTIC POLYMORPHISMS ASSOCIATED WITH THE OCCURRENCE AND SEVERITY OF ZIKA VIRUS CONGENITAL SYNDROME. SANTOS, C. N. O. Aracaju, 2019.

Zika virus (ZIKV) infection varies from asymptomatic to severe and can lead to severe neurological disorders, such as microcephaly. The immune response (IR) developed during ZIKV infection has not been fully elucidated and there are difficulties in knowing if the IR products detected during or after infection act as a cause or consequence of the infection. Moreover, the determining factors for the most severe forms associated with the infection are still unclear. ZIKV infection, like other infectious diseases, is multifactorial, in which susceptibility or resistance and clinical pattern are influenced by environmental and genetic factors of the host, with multigenic inheritance. Genetic determinants such as single nucleotide polymorphisms (SNPs), which are sites in the genome where variants of a nucleotide are common in the population, can act by modulating IR and contributing to the course of the different clinical outcomes. The present study evaluated the association of SNPs in CD209, TNF α , CXCL8, IL-4, IL-6, CCL2, TLR3, TLR4 and MICB genes with ZIKV infection by a case-control study. The case group was composed of children with microcephaly associated with ZIKV infection and the control group, composed of healthy children who were born in the same period of the ZIKV outbreak. In addition, we also compared the parents of the children with microcephaly with control mothers who had healthy children in the same period of the ZIKV outbreak, living in an endemic area to ZIKV infection. Genomic DNA from patients and controls were obtained and used in the genotyping of functional SNPs in candidate genes and the association with ZIKV infection was verified using the Chi-square test or Fisher's Exact Test. In this study, an association was found between the T allele in the SNP rs3775291 in the TLR3 gene with the occurrence of microcephaly resulting from Congenital Syndrome of ZIKV (SCZ). This allele was more frequent in the case mothers when compared to the control mothers. Moreover, we observed association of SNP rs1799964 in the TNF α gene in the newborns with severe microcephaly, in which the T allele was more frequent in children with severe microcephaly than in children with mild microcephaly at birth. In conclusion, this work brings together for the first time an association between the variant associated with a possible deleterious effect on the protein structure of TLR3, that may impair TLR3 signaling pathways in mothers who had children with microcephaly, suggesting that the impairment of this inflammatory pathway is an important factor in the control of ZIKV infection in the mothers and induction of neurological lesions in the fetus brain. In addition, the T variant of TNF α SNP, associated with low production of this cytokine, was more frequent in children with more severe microcephaly at birth, and it is possible that the lower TNF production reduces antiviral defense in the fetus, and contributes to central nervous system invasion by ZIKV. These data provide support for a better understanding of the immunological mechanisms, influenced by genetic factors, which predispose to different outcomes during ZIKV infections.

Descriptors: Infection. Microcephaly. Genetic polymorphisms. ZIKV.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 Características clínico-epidemiológicas dos indivíduos incluídos neste estudo.....	33
Tabela 2 Associação entre a ocorrência de sintomas e o uso de medicamento ou suplemento com a microcefalia.....	34
Tabela 3 Frequência e distribuição por grupo dos SNPs avaliados.....	35
Tabela 4 Teste de EHW na população controle para os SNPs estudados.....	37
Tabela 5 Frequência e distribuição alélica e genotípica do TLR3 rs3775291 e sua associação com microcefalia causada por ZIKV.....	39
Tabela 6 Associação alélica dos SNPs avaliados com a gravidade da microcefalia.....	40

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCL2 - Quimiocina CC 2
CCL22 - Quimiocina CC 22
C-CT - Crianças controle
CHIKV - Vírus Chikungunya
CLEC5A - *C-type lectin domain family 5-member A*
CM - Crianças com microcefalia
CMG - Crianças com microcefalia grave
C-MICRO - Crianças com microcefalia associada ao ZIKV
CXCL8 - Quimiocina CXC 8
DC-SIGN (CD209) - *dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*
DENV - Vírus da Dengue
DsRNA - Dupla fita de ácido ribonucleico
EHW - Equilíbrio de Hardy-Weinberg
ELISA - Ensaio de imunoabsorção enzimática
gDNA - Ácido desoxirribonucleico genômico
HCMV - Citomegalovírus humano
HGF - Fator de crescimento de hepatócito
HIV-1 - Vírus da imunodeficiência humana 1
HU-UFS - Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe
IC - Intervalo de confiança
IFN - Interferons
IFN-1 - Interferons do tipo 1
IFNAR1 - Receptor 1 do interferon
IFNAR2 - Receptor 2 do interferon
IFN α - Interferon alfa
IFN β - Interferon beta
IL-18 - Interleucina 18
IL-22 - Interleucina 22
IL-4 - Interleucina 4
IL-6 - Interleucina 6
IP-10 - Proteína 10 induzida por interferon gama
LIBM - Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular

MICB - Proteína B relacionada à cadeia 1 do complexo principal de histocompatibilidade

M-MICRO - Mães de crianças com microcefalia associada ao ZIKV

mRNA - Ácido ribonucleico mensageiro

M-ZIKVexp - Mães controle

M-ZIKVexp+ - Mães controle IgG positivo para ZIKV

N/A - Não aplicável

NFκB - Fator nuclear kappa B

NK - Células natural killer

OR - *Odds ratio*

PAMP - Padrão molecular associado ao patógeno

PC - Perímetro cefálico

P-MICRO - Pais de crianças com microcefalia associada ao ZIKV

PRR - Receptor de conhecimento padrão

qPCR - Reação em cadeia da polimerase em tempo real

RI - Resposta imune

RNA - Ácido ribonucleico

SCF - Fator de célula tronco

SCZ - Síndrome congênita do Zika vírus

SNC - Sistema nervoso central

SNP - Polimorfismo de nucleotídeo único

TBEV - Vírus da encefalite transmitida por carrapatos

TCLE - Termo de consentimento livre e esclarecido

TLR - Receptor toll-like

TLR3 - Receptor toll-like 3

TLR4 - Receptor toll-like 4

TNFRSF1A - Membro 1 A da superfamília do receptor de fator de necrose tumoral

TNFα - Fator de necrose tumoral alfa

X² - Qui-quadrado

ZIKV - Zika vírus

βNGF - Fator de crescimento nervoso do tipo beta

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	11
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	14
2.1 ZikaVírus.....	14
2.2 Aspectos epidemiológicos e clínicos das infecções por ZIKV.....	15
2.3 Aspectos imunológicos e genéticos associados às infecções por ZIKV.....	16
2.4 Papel dos SNPs na resposta imune.....	18
2.4.1 SNPs e susceptibilidade a infecções.....	19
2.4.1.1 SNP CCL2 (rs1024611)	19
2.4.1.2 SNP CXCL8 (rs2227306)	20
2.4.1.3 SNP TLR3 (rs3775291)	20
2.4.1.4 SNP TLR4 (rs10759930)	21
2.4.1.5 SNP TNF α (rs1799964)	21
2.4.1.6 SNP IL6 (rs1800795)	22
2.4.1.7 SNP IL4 (rs2243250)	22
2.4.1.8 SNP MICB (3132468)	22
2.4.1.9 SNP CD209 (rs2287886/ rs4804803)	23
3 OBJETIVO	24
3.1 Geral	24
3.2 Específicos	24
4 METODOLOGIA.....	25
4.1 Desenho do estudo e desenho experimental.....	25
4.2 Aspectos éticos	26
4.3 Local de realização do estudo.....	26
4.4 População estudada.....	26
4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	27
4.5 Coleta de informações clínico-epidemiológicas.....	28
4.6 Obtenção de soro e plasma.....	28
4.7 Obtenção de gDNA.....	28
4.7.1 Quantificação do gDNA.....	29
4.8 Genotipagem dos SNPs por qPCR.....	29

4.9 Diagnóstico da infecção por ZIKV.....	30
4.9.1 Diagnóstico por qPCR.....	30
4.9.2 Diagnóstico por sorologia- ELISA.....	30
4.10 Análise estatística.....	31
5 RESULTADOS.....	32
5.1 Pacientes e características clínico-epidemiológicas.....	32
5.2 Distribuição e comparação alélica e genotípica.....	35
5.2.1 Associação alélica e genotípica para TLR3 rs3775291	38
5.2.2 Associação entre as frequências alélicas do TNF α rs1799964 com a gravidade da microcefalia	39
6 DISCUSSÃO.....	41
7 CONCLUSÃO.....	45
8 PERSPECTIVAS	46
REFERÊNCIAS.....	47
APÊNDICE A: TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO.....	54
APÊNDICE B: QUESTIONÁRIO.....	59

As arboviroses têm alcançado um lugar de destaque na saúde pública mundial, causando epidemias emergentes e reemergentes em diferentes continentes. São causadas pelos arbovírus (*Arthropod Borne Virus*), vírus transmitidos essencialmente por artrópodes hematófagos durante o repasto sanguíneo, sendo os culicídeos do gênero *Culex* e *Aedes* os vetores das arboviroses mais importantes para a saúde humana (WEAVER; REISEN, 2010).

No Brasil, a alta incidência de arboviroses pelos vírus dos gêneros *Alphavirus*, causador da Chikungunya (CHIKV), e *Flavivirus*, causador da Dengue (DENV) dos tipos 1, 2, 3 e 4 e das doenças agudas pelo vírus Zika (ZIKV) são um grave problema de saúde pública. Dentre estas arboviroses, as infecções pelo ZIKV, transmitidas em áreas urbanas e periurbanas pelos mosquitos do gênero *Aedes*, ganharam destaque desde abril de 2015 devido a sua associação em larga escala com diversas complicações de ordem neurológica (BRASIL, 2018a, 2018b). Entre os anos de 2015-2017 foram notificados mais de 233 mil casos prováveis da doença aguda pelo ZIKV no país (BRASIL, 2018a). Neste período, notificações de manifestações neurológicas em adultos, a exemplo da Síndrome de Guillain-Barré e o crescente número de recém-nascidos com malformações congênitas graves no sistema nervoso central (SNC) e natimortos, principalmente na região Nordeste, foram reconhecidos como consequência das infecções por ZIKV, com associações confirmadas posteriormente em diversos estudos (ARAGÃO; LINDEN; BRAINER-LIMA; et al., 2016; CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; et al., 2016; PETERSEN; WILSON; TOUCH; et al., 2016). Em Sergipe, entre os anos de 2015-2016, foram registrados 221 casos da doença aguda pelo ZIKV e 270 casos notificados de microcefalia, com confirmação de 128 casos (SERGIPE, 2017).

Até o momento, o ano de 2018 registrou um número menor de casos de infecções por ZIKV em relação aos anos anteriores – 2.616 casos confirmados (BRASIL, 2018a) – contudo o risco de uma nova epidemia é eminente e alertado pela comunidade científica (WEAVER, 2018), visto que a dinâmica epidemiológica desta arbovirose ainda não está bem compreendida. Soma-se a este fator, a coexistência de outras doenças exantemáticas endêmicas causadas por vírus, com sintomatologia similar aos descritos na infecção por ZIKV, o que pode levar a subnotificação dos casos e exposição da população aos desfechos graves da doença.

A resposta imunológica (RI) desenvolvida durante a infecção por ZIKV não está completamente elucidada e existem dificuldades na compreensão das nuances que contribuem para o agravamento dos casos (PIERSON; DIAMOND, 2018). Por tratar-se de uma doença de herança complexa ou multifatorial, na qual os determinantes ambientais, do patógeno e do

hospedeiro exercem influência tanto na ocorrência de doença como em sua apresentação clínica, espera-se também que as infecções por ZIKV sejam influenciadas por um conjunto de fatores orquestrados pela genética do hospedeiro. Nesse sentido, estudos sobre determinantes genéticos que influenciam a resposta imune do hospedeiro ao ZIKV e seu papel no curso da infecção contribuem para o entendimento da imunopatogênese da doença.

A existência de polimorfismos genéticos pode explicar a susceptibilidade ou resistência à doenças de herança complexa, incluindo as doenças infecciosas. Dentre estes, os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), que são sítios no genoma onde variantes de um nucleotídeo são comuns na população (ALBERTS; JOHNSON; LEWINS et al., 2017), são importantes na identificação de genes que podem estar relacionados à predisposição a doenças. Estudos nos últimos anos sobre estes determinantes genéticos na RI têm esclarecido a imunopatogênese de diversas doenças infecciosas (CASANOVA; ABEL, 2002; KHOR; CHAU; PANG; et al., 2011; FANG; HU; SHANG; et al., 2012; MCLAREN; CARRINGTON, 2015).

A vantagem de um estudo genético consiste na possibilidade de avaliar a influência de genes antes da ocorrência da doença, pois ao se avaliar a RI de um indivíduo com doença, na maioria dos casos, não é possível discernir se os achados são causa ou consequência do “status” da doença. Ao contrário, a associação de SNPs funcionais, que afetam a produção de determinadas citocinas ou outros produtos da RI, dá subsídios para entender melhor a influência dos produtos da RI na ocorrência ou apresentação clínica da doença, pois os polimorfismos determinam alterações na RI antes da infecção ocorrer.

Até o momento, há poucos estudos avaliando o papel da genética do hospedeiro e dos SNPs em genes da RI nas infecções pelo ZIKV. Porém, as lacunas existentes acerca dos fatores determinantes para o acometimento de desordens neurológicas ainda impedem o entendimento da imunopatogênese relacionada ao desenvolvimento da doença e o avanço de medidas para controlar a infecção. Assim, elucidá-los, através da identificação de SNPs que podem alterar o fenótipo da RI, torna-se uma via importante para o aumento das alternativas imunoproliféricas e imunoterapêuticas para esta doença.

Desse modo, compreendendo a importância dos mecanismos imunogenéticos no curso e na determinação das fisiopatologias das doenças causadas pelo ZIKV, e considerando a hipótese de SNPs funcionais em genes da RI interferirem na determinação dos desfechos mais graves das infecções, neste estudo, investigamos a associação de SNPs em genes da RI com a Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ).

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Zika Vírus

O ZIKV foi isolado pela primeira vez em 1947 de um macaco *Rhesus*, proveniente da floresta Zika, Uganda, e isolado de mosquitos em 1948 (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). O primeiro caso documentado de infecções com sintomatologia em humanos foi confirmado pelo isolamento do vírus em 1952 (MACNAMARA, 1954).

Este arbovírus é um membro da família *Flaviviridae*, pertencente ao gênero *Flavivirus* e compartilha de uma biologia bastante similar aos demais flavivírus descritos e circulantes nas regiões do Brasil (PETERSEN, 2016; HASAN; SEVVANA; KUHN; et al., 2018). O ZIKV possui um envelope lipídico icosaédrico de aproximadamente 500 Å e seu material genético é composto por uma fita simples-positiva de ácido ribonucleico (RNA). Este genoma é envolvido por um capsídeo viral e codifica uma única poliproteína que é clivada em 3 glicoproteínas estruturais (C, prM/M, E) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2, NS2B, NS3, NS4B, NS5) (HASAN; SEVVANA; KUHN; et al., 2018).

São descritas duas diferentes linhagens de ZIKV, a africana e a asiática, que possuem alta similaridade genética e cerca de 12% de diferenças entre seus genomas (HADDOW; SCHUH; YASUDA; et al., 2012). Filogeneticamente, a epidemia no Brasil foi causada por uma cepa derivada da linhagem asiática do vírus (LANCIOTTI; LAMBERT; HOLODNIY; et al., 2016).

Um estudo recente mostrou evidências de que diferenças no genoma das duas linhagens, relacionadas à substituição de aminoácidos na proteína estrutural prM, conferiu à cepa asiática do ZIKV maior virulência e um potencial neuroinvasivo maior do que a sua linhagem antecessora, demonstrado em infecção de camundongos, o que pode ter sido um fator importante para os desfechos relatados nos surtos recentes de infecções por ZIKV (YUAN; HUANG; LIU; et al., 2017). O potencial neuroinvasivo da linhagem asiática do vírus também foi demonstrado em experimento com cultura de células progenitoras neurais e neurônios derivados de células tronco pluripotentes humanas. Neste, a linhagem asiática prejudicou a proliferação e migração das células progenitoras neurais e comprometeu a maturação dos neurônios, sem causar grande indução de morte celular, funções que juntas podem contribuir para os mecanismos patológicos existentes nas alterações e malformações neurológicas advindos da infecção por ZIKV (GOODFELLOW; WILLARD; WU; et al., 2018).

2.2 Aspectos epidemiológicos e clínicos das infecções por ZIKV

Desde o seu primeiro isolamento, em 1947, as infecções por ZIKV foram documentadas de forma esporádica e sem ocorrência de complicações clínicas, até o ano de 2007, quando casos de infecções por ZIKV foram reportados fora dos continentes asiático e africano, com destaque para uma epidemia na Polinésia Francesa e a circulação do vírus por vários países da Oceania. Em 2013-2014, surtos ocorreram na Nova Caledônia, Polinésia Francesa, Ilhas Cook, Ilha de Páscoa, Vanuatu Samoa, Brasil (2015) e recentemente (março de 2016), 31 países nas Américas relataram transmissão autóctone deste vírus (DUFFY; CHEN; HANCOCK; et al., 2009; CAO-LORMEAU; ROCHE; TEISSIER; et al., 2014; IOOS; MALLET; LEPARC GOFFART; et al., 2014; CAO-LORMEAU; BLAKE; MONS; et al., 2016).

Entre os anos de 2015-2017 foram notificados mais de 233 mil casos prováveis da doença aguda pelo ZIKV no Brasil (BRASIL, 2018a). Em Sergipe, foram registrados 221 casos da doença aguda pelo ZIKV entre os anos de 2015-2016 (SERGIPE, 2017). No Brasil, apesar de, até o momento, o ano de 2018 ter registrado um número menor de casos de infecções por ZIKV - 2.616 casos confirmados (BRASIL, 2018a) - em relação aos anos anteriores, a dinâmica epidemiológica desta arbovirose ainda não está clara e o risco de uma nova epidemia é alto e alertado pela comunidade científica (WEAVER, 2018).

A transmissão do ZIKV ocorre essencialmente através da picada de mosquitos durante o repasto sanguíneo porém, também pode ocorrer por via sexual (MUSSO; ROCHE; ROBIN; et al., 2015), por meio de transfusões sanguíneas, fluidos corporais e verticalmente. Estas formas secundárias mostraram-se bastante relevantes epidemiologicamente para a transmissão e no curso de desfechos graves advindos da infecção (ARAGÃO, M.F.V.; LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, 2016).

As infecções por ZIKV são em sua maioria assintomáticas (cerca de 60 a 80%). Para as infecções sintomáticas, é relatada sintomatologia leve e inespecífica que incluem erupção cutânea, febre moderada, artralgia, conjuntivite, mialgia, dor retro-orbital e dor de cabeça, com duração aproximada de 3 a 7 dias (PETERSEN, 2016; PIERSON; DIAMOND, 2018; RIBEIRO; MARQUES; JESUS; et al., 2016). Em função da inespecificidade de sintomas, a infecção por ZIKV pode ser confundida com outras doenças exantemáticas febris, principalmente as causadas pelos vírus DENV e CHIKV (PETERSEN, 2016). Esse aspecto, somado à indisponibilidade de testes diagnósticos específicos nas unidades hospitalares, pode ter contribuído para a subnotificação dos casos e desconhecimento da real incidência das doenças causadas pelo vírus Zika no Brasil (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015; PETERSEN, 2016).

Um outro ponto importante é a coinfeção dos arbovírus DENV e CHIKV com a infecção por ZIKV, já documentada em áreas endêmicas no Brasil e outros países das américas (VILLAMIL-GÓMEZ; RODRÍGUEZ-MORALES; URIBE-GARCÍA; et al., 2016; ZAMBRANO; WAGGONER; ALMEIDA; et al., 2016; CARRILLO-HERNÁNDEZ; RUIZ-SAENZ; VILLAMIZAR; et al., 2018). Este aspecto, além de ser contributivo para a subnotificação dos casos de infecções por ZIKV, é visto como um possível agravante para a condição de saúde do paciente, que pode vir a desenvolver quadros sintomatológicos mais graves como decorrência da coinfeção, uma vez que o espectro de doença apresentado durante as coinfeções ainda não está completamente claro.

Contudo, a associação do ZIKV com meningoencefalites, Síndrome de Guillain-Barré e outras complicações neurológicas em adultos (SOUZA; KEESEN; ALMEIDA; et al., 2014; CAO-LORMEAU; BLAKE; MONS; et al., 2016; SMITH; MACKENZIE, 2016; ACOSTA-AMPUDIA; MONSALVE; CASTILLO-MEDINA; et al., 2018) e com a Síndrome Congênita do Zika, caracterizada por uma série de malformações congênitas de ordem neurológica e estrutural, que podem acometer o feto quando a mãe é infectada por ZIKV durante a gestação, são a maior preocupação quanto ao acometimento de infecções (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; et al., 2016; SANTOS; GOLDENBERG, 2016; LUCCHESI; KANDUC, 2016; PLATT; SMITH; ARORA; et al., 2018)

2.3 Aspectos imunológicos e genéticos associados às infecções por ZIKV

A RI desenvolvida durante a infecção por ZIKV não está completamente esclarecida e existem dificuldades na compreensão de quais fatores induzidos pela infecção modulam a RI e contribuem para o agravamento dos casos clínicos (PIERSON; DIAMOND, 2018). Contudo, estudos já demonstram a participação de diversos mecanismos da RI inata e adaptativa atuando como moduladores da infecção.

Eventos da RI inata que interferem no reconhecimento do ZIKV e no controle inicial a infecção são alvo de diversos estudos em modelos animais e *in vitro*. Mecanismos envolvendo os interferons (IFN) do tipo 1, como os Interferons alfa (IFN α) e beta (IFN β), e seus receptores IFNAR1 e IFNAR2, mostraram ser relevantes para o curso da infecção. Fêmeas de camundongos grávidas, *knockout* para o IFNAR1 e selvagens tratadas com anticorpos anti-IFNAR1 apresentaram infecção na placenta e mortes fetais (MINER; CAO; GOVERO; et al., 2016). Corroborando com isso, outro estudo mostrou que a produção de Interferon (IFN) tem função antiviral frente à infecção pelo ZIKV em células da placenta humana (BAYER;

LENNEMANN; OUYANG; et al., 2016). A inibição das vias do IFN constituem um dos principais mecanismos de evasão do ZIKV à RI inata (GRANT; PONIA; TRIPATHI; et al., 2016) e, além disso, o ZIKV parece ter como alvo de infecção células que não possuem uma RI inata naturalmente eficiente, como as células progenitoras neurais (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Em relação à resposta imune adaptativa, estudos têm demonstrado as respostas mediadas por células T frente à infecção por ZIKV, porém pouco se sabe sobre como ela ocorre em humanos. Foi demonstrado que, em camundongos, a ativação de linfócitos TCD8⁺ podem reduzir a carga viral e que a depleção dessas células ou deficiências genéticas destas células levam ao aumento da carga viral frente à infecção por ZIKV (ELONG NGONO; VIZCARRA; TANG; et al., 2017).

O funcionamento das células B frente à infecção por ZIKV também vem sendo elucidado. A detecção de anticorpos IgM contra ZIKV ocorre, em geral, após o terceiro dia de início dos sintomas clínicos e após oito dias, anticorpos do tipo IgG já podem ser detectados no soro (ROGERS; GOODWIN; BRINEY; et al., 2017). Estudos mostram que uma imunidade prévia a outros flavivírus, como o DENV, é associada à reação cruzada de anticorpos, devido à similaridade genética molecular dos vírus. Esse aspecto pode afetar negativamente a produção de anticorpos específicos para ZIKV, quando comparado com a resposta de indivíduos nunca infectados com outros flavivírus (ROGERS et al., 2017; STETTLER, et al., 2016). Outros estudos também apontam para uma eficiente memória imunológica desenvolvida pós infecção pelo ZIKV. Assim, a prevalência de indivíduos sorologicamente positivos para ZIKV está sendo relacionada ao decréscimo no número de casos da doença após o surto inicial em 2015 (NETTO; MOREIRA-SOTO; PEDROSO; et al., 2017).

Alguns biomarcadores da RI já foram descritos como característicos da infecção por ZIKV a partir de análises de soro de pacientes acometidos pelo vírus. Entre eles, interleucina-22 (IL-22), proteína 10 induzida por interferon gama (IP-10), proteína 1 quimiotática de monócitos (MCP1) e fator de necrose tumoral alfa (TNF α) mostraram-se aumentados em mulheres grávidas que foram infectadas por ZIKV e carregavam crianças com malformações congênitas, quando comparadas com as que carregavam crianças normais, as quais apresentaram aumento de fator de crescimento nervoso do tipo beta (β NGF) e fator de célula tronco (SCF). Diferenças na expressão de interleucina-18 (IL-18), IP-10 e fator de crescimento do hepatócito (HGF) também foram encontradas entre crianças que nasceram com ou sem anormalidades congênitas associadas à infecção por ZIKV (KAM; LEITE; LUM;

et al., 2017). O membro 1A da superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNFRSF1A) e a quimiocina 22 do motivo CC (CCL22) também foram associados com infecção por ZIKV induzindo anomalias fetais (FOO; CHEN; CHAN; et al., 2018). Entretanto, não é possível determinar se esses achados decorrem de uma baixa produção natural destes marcadores, o que seria um preditivo de susceptibilidade, ou ocorrem como consequência da infecção. Nesse sentido, estudos que avaliem o *background* genético do hospedeiro são imprescindíveis para elucidar como a modulação da RI nos momentos iniciais da infecção afeta o comportamento clínico das doenças associadas ao ZIKV.

2.4 Papel dos SNPs na resposta imune

Pouco se conhece a respeito dos fatores do hospedeiro que regulam a susceptibilidade à infecção por ZIKV. Contudo, por se tratar de uma doença de herança multifatorial, espera-se que as infecções por ZIKV e o desenvolvimento das formas mais graves da doença sejam influenciados pelas características genéticas do hospedeiro.

Corroborando neste sentido, Caires-Júnior, Goulart, Melo, et al. (2018) demonstraram, através da análise do exoma completo, que gêmeos dizigóticos, discordantes para a microcefalia (em que uma criança nasceu com microcefalia e a outra nasceu sem malformações congênitas), expostos à infecção por ZIKV durante a gestação, não possuíam variações genéticas de herança monogênica que explicassem a microcefalia nos gêmeos acometidos. Apesar disso, as células progenitoras neurais dos gêmeos acometidos demonstraram diferenças na expressão gênica e maior suscetibilidade à infecção por ZIKV *in vitro*, quando comparadas com células dos gêmeos não acometidos. Assim, possíveis variações gênicas funcionais nos gêmeos com microcefalia parecem ser importantes e podem explicar a patogênese causada pelo ZIKV, levando a diferentes respostas frente à infecção.

Dentre os fatores genéticos, os SNPs são variações intraespécies caracterizadas por uma mutação simples na sequência genômica de determinada população. Estes sítios no genoma, onde variantes de um nucleotídeo são comuns na população, representam a maior fonte de variabilidade genética entre os indivíduos e está relacionado à diferenças fenotípicas relevantes para a área da saúde, uma vez que podem determinar variações funcionais, como diferenças na produção de proteínas (ALBERTS, JOHNSON, LEWINS, 2017).

2.4.1 SNPs e susceptibilidade a infecções

Os componentes da resposta imune inata e adaptativa podem estar sob influência de SNPs e a existência destes explica a susceptibilidade ou resistência a diversas doenças infecciosas. Nas doenças virais, a exemplo da dengue, SNPs nos genes dos receptores Toll like (TLR) foram associados a desfechos mais graves da doença (ALAGARASU; BACHAL; MEMANE; et al., 2015), assim como SNPs nos genes da proteína B relacionada à cadeia 1 do complexo principal de histocompatibilidade (MICB) e no membro A da família do domínio da lectina do tipo C 5 (CLEC5A) (KHOR; CHAU; PANG; et al., 2011; XAVIER-CARVALHO; CEZAR; FREIRE; et al., 2017).

Estudo recente, realizado a partir do sequenciamento do exoma de mães de crianças com SCZ que foram infectadas por ZIKV durante a gestação, encontrou associação de variações do tipo SNP nas mães que tiveram crianças com a SCZ, quando comparadas com mães que foram positivas para ZIKV durante a gestação, mas que tiveram crianças saudáveis. Os genes mais altamente correlacionados com SCZ foram os que codificam a adenilato ciclase, enzima importante para a transdução de sinal em células eucariotas, regulando a RI inata e adaptativa, o que pode interferir diretamente no curso da infecção pelo ZIKV (ROSSI; FAUCZ; MELO; et al., 2018).

Porém, SNPs localizados em outras regiões gênicas como íntrons ou em regiões intergênicas, também podem ser funcionais e afetar o curso da produção de outras proteínas da resposta imune, principalmente alterando a quantidade do produto gênico transcrito. Sendo assim, a identificação de SNPs funcionais em outras regiões gênicas que podem estar associados aos desfechos decorrentes de infecções por ZIKV, podem ajudar a elucidar a patogênese da doença e assim contribuir para a geração de tratamentos baseados em imunoterapias e medidas profiláticas efetivas. Neste ínterim, diversos estudos têm demonstrado a participação de SNPs em diversas doenças infecciosas, incluindo infecções por outros arbovírus, principalmente SNPs em genes importantes para a resposta imune a vírus.

2.4.1.1 SNP CCL2(rs1024611)

O gene CCL2 (*C-C motif chemokine ligand 2*) está localizado na banda 12 do braço longo do cromossomo 17 (17q12) e codifica a proteína de mesmo nome, também conhecida como MCP1. Esta proteína tem função quimiotática e atua no recrutamento de leucócitos em geral, sendo a mais importante para o recrutamento de monócitos para o sítio de infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs1024611 é uma variação na posição -2518 A>G, reconhecida como região promotora do gene. Esta variante modula a expressão desta quimiocina, sendo os heterozigotos e homozigotos para o alelo G nesse SNP os que apresentam mais altos níveis de produção desta proteína (ROVIN; LU; SAXENA, 1999). O genótipo GG para este SNP foi associado com o risco de trombocitopenia em infecções por DENV em pacientes na Índia. (ALAGARASU; BACHAL; DAMLE; et al., 2015).

2.4.1.2 SNP CXCL8 (rs2227306)

O gene CXCL8 (*C-X-C motif chemokine ligand 8*) está localizado na banda 13 do braço longo do cromossomo 4 (4q13) e codifica a proteína de mesmo nome, também conhecida como Interleucina 8 (IL8). Esta proteína atua como quimiocina, importante para o recrutamento de neutrófilos para os sítios de infecção (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). O aumento nos níveis de IL8 estão relacionados a diversas infecções, como as causadas pelo DENV, na qual níveis elevados desta quimiocina estão associados aos eventos iniciais da forma mais grave da doença (HUANG; LEI; LIU; et al., 2000).

O SNP rs2227306 é caracterizado pela variação C>T intragênica na posição +781 e mostrou-se funcional e relacionado a alterações nos níveis de expressão gênica e quantidade de IL8 (BENAKANAKERE; FINOTI; TANAKA; et al., 2016).

2.4.1.3 SNP TLR3 (rs3775291)

O gene receptor do tipo Toll 3 (TLR3) está localizado na banda 35 do braço longo do cromossomo 4 (4q35) e codifica a glicoproteína integral de membrana de mesmo nome que atua como receptor de reconhecimento padrão (PRR), expresso principalmente em membranas intracelulares e reconhecem RNA de fita dupla (dsRNA). Este reconhecimento desencadeia vias de sinalização que induzem múltiplos eventos importantes da RI inata contra infecções virais (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs3775291 leva a uma variação *missense* funcional caracterizada pela variação c.1234 C>T que resulta na mudança do resíduo de aminoácido leucina para fenilalanina na posição 412 (L412F). Este SNP tem sido associado a algumas doenças virais como as causadas pelo vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) (SIRONI; BIASIN; CAGLIANI; et al., 2012), citomegalovírus humano (HCMV) (STUDZIŃSKA; JABŁOŃSKA; WIŚNIEWSKA-LIGIER; et al., 2017), DENV (ALAGARASU; BACHAL;

MEMANE; et al., 2015) e vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (KINDBERG; VENE; MICKIENE; et al., 2011).

Quanto à funcionalidade deste polimorfismo, existem resultados contraditórios no que se refere ao efeito de rs3775291 na expressão de TLR3. Estudo em HIV-1 demonstra que o alelo T (TLR3 contendo fenilalanina) está associado a maior produção de citocinas inflamatórias em indivíduos expostos à infecção pelo HIV-1 e que persistem com sorologia negativa ((SIRONI; BIASIN; CAGLIANI; et al., 2012). Nessa hipótese, esse polimorfismo seria responsável pelo aumento da inflamação. No entanto, os estudos funcionais *in vitro* demonstram que o alelo T leva à produção de TLR3 com função diminuída. Ensaio baseado em luciferase dupla mostraram que o TLR3 contendo a fenilalanina reduz a ativação de NFκB em 50% em comparação com o TLR3 contendo leucina (ZHOU; FAN; YU; et al., 2011).

2.4.1.4 SNP TLR4 (rs10759930)

O gene receptor do tipo Toll 4 (TLR4) está localizado na banda 33 do braço longo do cromossomo 9 (9q33) e codifica a glicoproteína integral de membrana de mesmo nome, que exerce função de PRR na superfície celular, reconhecendo padrões moleculares associados ao patógeno (PAMPs) microbianos, desencadeando vias de sinalização que culminam na ativação da resposta inflamatória (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs10759930 é caracterizado pela variação C>T na região promotora e foi associado com malformações do corpo cavernoso cerebral (TANG; CHOI; KOTZIN; et al., 2017).

2.4.1.5 SNP TNFα (rs1799964)

O gene TNFα está localizado na banda 21 do braço curto do cromossomo 6 (6p21) e codifica uma proteína de mesmo nome, também chamada de linfotóxina-α. A proteína TNF-α atua como citocina pró-inflamatória, mediando a resposta inflamatória aguda a microrganismos infecciosos (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs1799964 é caracterizado pela variação -1031 T>C e o alelo C tem sido associado com o aumento da expressão desta citocina (KAMIZONO; YAMADA; KIMURA; et al., 1998) e o genótipo TC para este SNP está associado ao aumento do risco de infecções congênicas por HCMV (KASZTELEWICZ; CZECH-KOWALSKA; LIPKA; et al., 2017).

2.4.1.6 SNP IL6 (rs1800795)

O gene interleucina 6 (IL6) está localizado na banda 15 do braço curto do cromossomo 7 (7p15) e codifica uma proteína de mesmo nome que atua como citocina pró-inflamatória importante para as funções efetoras da RI inata. A IL-6 é indutora de outros mediadores inflamatórios e atua na diferenciação de células T (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs1800795 é caracterizado pela variação -174 G>C onde o alelo G é associado a altos níveis de transcrição, demonstrado em estudos in vitro em células HeLa, utilizando plasmídeos comparando o alelo G com o C (FISHMAN; FAULDS; JEFFEY; et al., 1998). Além disso, esse alelo foi associado a altos níveis de citocina no plasma e ao risco de desenvolvimento de sarcoma de Kaposi em paciente infectados com HIV-1 (HUANG; LEI; LIU; et al., 2000) e a persistência de sintomas em pacientes com dengue (DETTOGNI; TRISTÃO-SÁ; DOS SANTOS; et al., 2015).

2.4.1.7 SNP IL4 (rs2243250)

O gene interleucina 4 (IL4) está localizado na banda 31 do braço longo do cromossomo 5 (5q31) e codifica uma proteína de mesmo nome que possui funções com características anti-inflamatórias, atuando principalmente na ativação da via alternativa de macrófagos, diferenciação de células T e troca de isotipo para IgE nas células B (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs2243250 é caracterizado pela variação -590 C>T que tem sido associada a progressão clínica de pacientes infectados com vírus da hepatite B e C (GAO; XIE; WANG; et al., 2017), a pacientes não responsivos ao tratamento antirretroviral contra HIV-1 (BRANDÃO; CROVELLA, 2018), e a não persistência de sintomas em pacientes infectados por DENV (DETTOGNI; TRISTÃO-SÁ; DOS SANTOS; et al., 2015).

2.4.1.8 SNP MICB (rs3132468)

O gene MICB está localizado na banda 21 do braço curto do cromossomo 6 (6p21) e codifica proteína de mesmo nome que atua como receptor de ativação celular. MICB é um ligante induzido por estresse do receptor de ativação NKGD2, expresso em células Natural Killer (NK), linfócitos TCD8⁺ e linfócitos T $\gamma\delta$ e desempenha importante função no controle de infecções virais através da ação das células NK (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015).

O SNP rs3132468 é caracterizado pela variação T>C e foi identificado como um locus de susceptibilidade à dengue grave em estudo de associação *genome-wide* (KHOR; CHAU; PANG; et al., 2011), e associado à dengue sintomática (GARCÍA; DEL PUERTO; PÉREZ; et al., 2011).

2.4.1.9 SNP CD209 (rs2287886/ rs4804803)

O gene CD209 está localizado na banda 13 do braço curto do cromossomo 19 (19p13) e codifica a proteína de mesmo nome, também conhecida como DC-SIGN (*dendritic cell-specific ICAM-grabbing non-integrin*). O DC-SIGN é um receptor da família das lectinas do tipo C e atua reconhecendo PAMPs derivados de carboidratos, importante para a promoção da RI através da modulação funcional de células dendríticas e ativação dos linfócitos T CD4⁺ (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Este receptor também é utilizado por muitos vírus como HCMV e o HIV como via de entrada na célula (BACKOVIC; REY, 2012).

O SNP rs2287886 é caracterizado pela variação na posição -139 A>G, localizado na região promotora e o genótipo GG para este SNP tem sido associado com o desfecho mais grave em pacientes infectados pelo DENV (ALAGARASU; DAMLE; BACHAL; et al., 2013) e com a modulação da RI humoral após vacinação contra o vírus da rubéola (HARALAMBIEVA; LAMBERT; OVSYANNIKOVA; et al., 2014) e o alelo G, com reatividade de HCMV e presença de doença (MEZGER; STEFFENS; SEMMLER; et al., 2007). O alelo A foi associado ao risco de desenvolvimento das formas mais graves de doenças causadas pelo TBEV (BARKHASH; PERELYGIN; BABENKO; et al., 2012).

O SNP rs4804803 também está localizado na região promotora do gene e é caracterizado pela variação -336 A>G. O alelo G deste SNP foi associado à severidade de infecções virais por DENV (CHUANSUMRIT; SAKUNTABHAI; TURBPAIBOON; et al., 2005).

3 OBJETIVO

3.1 Geral

Avaliar a associação entre SNPs em genes candidatos com a Síndrome Congênita do ZIKV e outras informações fenotípicas do desfecho clínico da doença.

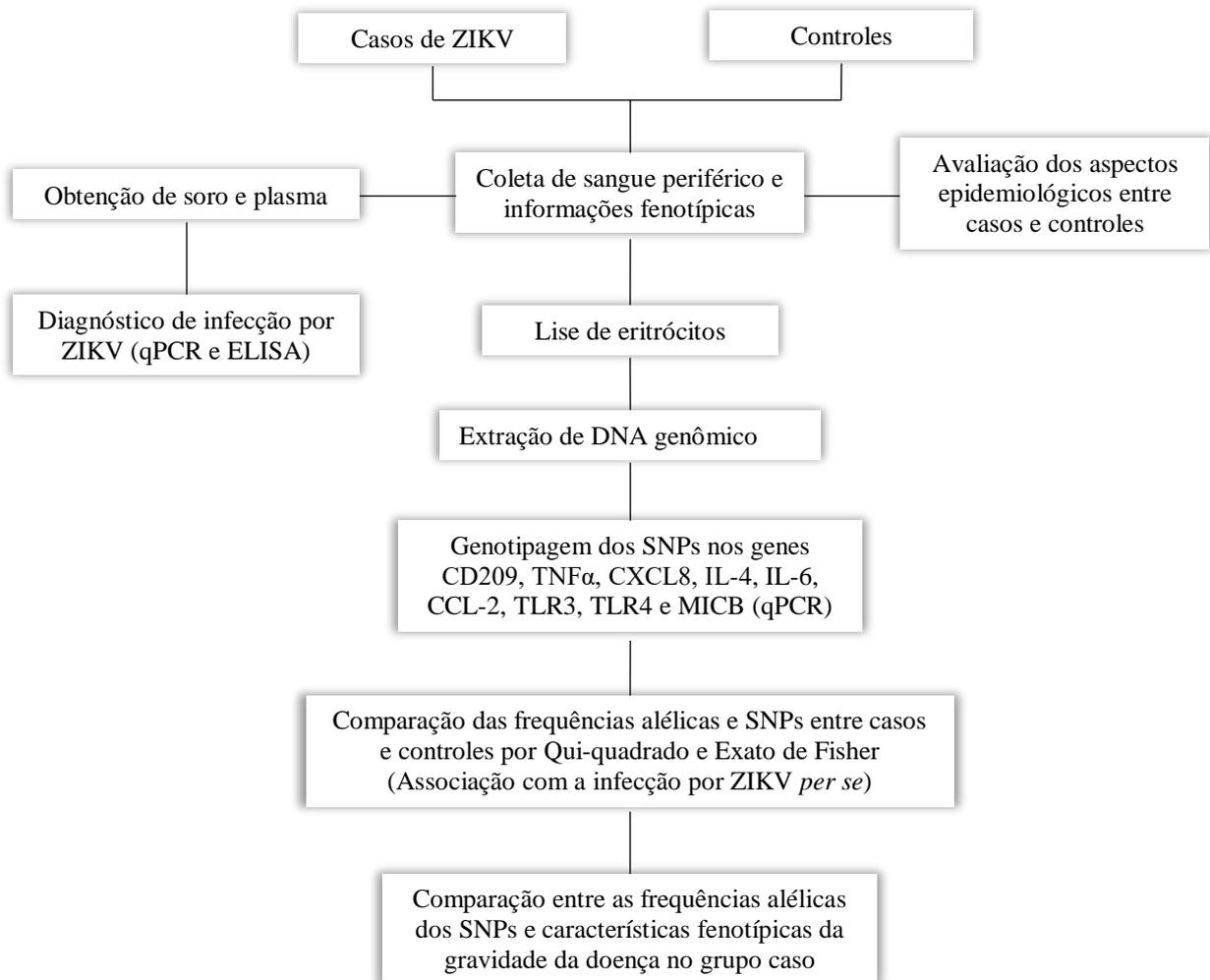
2.2 Específicos

1. Comparar as frequências alélicas e genotípicas de SNPs nos genes CD209, TNF α , CXCL8, IL-4, IL-6, CCL-2, TLR3, TLR4 e MICB, em grupos de pais e crianças com microcefalia e pais e crianças controles;
 - *Hipótese: Polimorfismos genéticos em genes candidatos, importantes para a resposta imune a vírus, estão associados a infecção por ZIKV.*
2. Analisar diferenças genéticas entre indivíduos infectados pelo ZIKV e entre crianças com microcefalia, com quadros clínicos de diferentes gravidades;
 - *Hipótese: Polimorfismos genéticos em genes candidatos, importantes para a resposta imune a vírus estão associados a quadros clínicos mais graves.*
3. Avaliar aspectos epidemiológicos associados à infecção por ZIKV ou à apresentação clínica de sintomas, comparando grupos de pais e crianças com microcefalia com pais e crianças controles.

4 METODOLOGIA

4.1 Desenho do estudo e desenho experimental

Este estudo é do tipo caso-controle retrospectivo. As metodologias utilizadas para a elucidação dos objetivos estão agrupadas de acordo com o desenho experimental exposto abaixo.



4.2 Aspectos éticos

Este estudo envolveu pesquisa com seres humanos e cumpriu as recomendações das resoluções 196/96 e 466/12 da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa. Faz parte de um Projeto mais amplo, aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa da Universidade Federal de Sergipe, intitulado “*Estudo epidemiológico, clínico e imunológico nas infecções pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue na patogênese de anomalias fetais e em doenças de indivíduos adultos*” (CAAE 54835916.2.0000.5546).

4.3 Local de realização do estudo

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (LIBM) da Universidade Federal de Sergipe, localizado no Hospital Universitário da Universidade Federal de Sergipe (HU-UFS). Parte das amostras biológicas foi colhida nos serviços de atendimento do HU-UFS, outra parte foi colhida em coletas de campo nos municípios de Aracaju, Nossa Senhora do Socorro, Itabaiana e Campo do Brito.

4.4 População estudada

Foram recrutados pacientes que se apresentaram por demanda espontânea e consecutiva nos ambulatórios de infectologia, pediatria, clínica médica ou de outros serviços do HU-UFS, com quadros clínicos sugestivos de arboviroses ou que tiveram associação prévia com a infecção por ZIKV. Também foram recrutados pacientes por meio de busca ativa em coletas de campo nos municípios de Aracaju, Nossa Senhora do Socorro, Itabaiana e Campo do Brito. Casos clínicos suspeitos de arboviroses incluíram pacientes que apresentam febre, dores musculares, dores articulares, cefaleia, náuseas e exantema maculopapular. Casos clínicos com associação prévia com a infecção por ZIKV incluíram trios de pais e crianças com microcefalia, nascidas durante a epidemia de ZIKV (de julho de 2015 a março de 2017). O HU-UFS é unidade de referência para o atendimento, tratamento e reabilitação dos casos de microcefalia de todos os municípios do estado de Sergipe.

Foram recrutados:

- Grupo caso:
 - ✓ Mães de crianças com microcefalia associada à infecção por ZIKV (M-MICRO);
 - ✓ Pais de crianças com microcefalia associada à infecção por ZIKV (P-MICRO);
 - ✓ Crianças com microcefalia associada à infecção por ZIKV (C-MICRO).

- Grupo controle:
 - ✓ Mães de crianças de área endêmica às infecções por ZIKV, que tiveram filhos sem microcefalia, nascidos no mesmo período do surto de ZIKV (M-ZIKV_{exp});
 - ✓ Crianças saudáveis de área endêmica a infecção por ZIKV, que nasceram no mesmo período do surto de ZIKV (C-CT).

Para análise, as crianças do grupo caso foram subdivididas a partir do valor do perímetro cefálico (PC) ao nascimento, utilizando-se a classificação para microcefalia adotada pela Organização Mundial da Saúde, em:

- crianças com microcefalia (CM): mais do que dois desvios-padrão abaixo da média, para a idade gestacional e sexo;
- Crianças com microcefalia grave (CMG): mais do que três desvios-padrão abaixo da média, para a idade gestacional e sexo.

Na sessão de resultados do presente estudo, utilizaremos as siglas descritas acima para discriminar os respectivos grupos.

4.4.1 Critérios de inclusão e exclusão

Todos os indivíduos maiores de 18 anos e os pais ou responsáveis dos menores de 18 anos assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) (APÊNDICE A), após receber informações verbais dos pesquisadores sobre os procedimentos da pesquisa. A autonomia dos participantes foi garantida por meio da administração cuidadosa do TCLE informando que a participação dos mesmos era voluntária. Após aceitação do paciente em participar do estudo, a infecção por ZIKV foi confirmada através da técnica de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (qPCR) ou por Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA) descritas no item 4.9.1 e 4.9.2 respectivamente.

Os pacientes que se recusaram a participar da pesquisa, pacientes que receberam tratamentos imunossupressores e pacientes com comorbidades (incluindo infecção por HIV e malignidade) foram excluídos do estudo. Para o Grupo caso, os pacientes que foram diagnosticados como ZIKV negativo também foram excluídos deste estudo. Estes continuaram a ser beneficiados com o tratamento e acompanhamento devidos nos ambulatórios do HU-UFS. Diagnósticos clínicos e os testes sorológicos foram realizados pela

equipe médica do HU-UFS para confirmar os danos neurológicos das crianças que foram incluídas no grupo caso. Outras infecções que poderiam induzir lesão neurológica foram descartados por meio de investigação clínica e testes sorológicos.

4.5 Coleta de informações clínico-epidemiológicas

Informações clínico-epidemiológicas foram coletadas por meio de entrevista semiestruturada a partir de questionário (APÊNDICE B) aplicado por nós, pesquisadores.

4.6 Obtenção de soro e plasma

Por meio de punção venosa, foram coletados 4 mL de sangue total em tubos sem anticoagulante e 4 mL em tubos contendo anticoagulante EDTA K2. Os tubos foram centrifugados a 1600 g por 10 min à temperatura ambiente, para a separação do soro e plasma, respectivamente.

4.7 Obtenção de gDNA

Amostra de 8,5 mL de sangue total foram coletadas em tubos contendo Ácido Cítrico, Citrato de Sódio e Dextrose. Em seguida, os eritrócitos foram lisados utilizando um tampão de lise a base de sacarose. A partir deste lisado e utilizando amostras de 200 µL de sangue total coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA K2, foi extraído o gDNA usando o PureLink® Genomic DNA Mini Kit (Invitrogen™), segundo as instruções do fabricante. De forma breve, foram adicionadas 20 µL de RNase A e 20 µL de proteinase K às amostras de sangue total ou as amostras lisadas, e estas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado a cada amostra 200 µL do tampão de lise, e estas foram incubadas por 10 min à 55 °C. A reação foi interrompida adicionando 200 µL de álcool etílico absoluto e 640 µL da amostra foi então centrifugado a 10.000 g por 1 min, à temperatura ambiente, em coluna de centrifugação baseada em sílica do kit. Em seguida, as amostras de gDNA retidas na coluna foram lavadas por adição do tampão de lavagem 1 e centrifugadas a 10.000 g por 1 min à temperatura ambiente e com o tampão de lavagem 2 e centrifugadas a velocidade máxima por 3 min à temperatura ambiente. Após as lavagens, as amostras de gDNA retidas na coluna foram eluídas por adição o 80 µL do tampão de eluição do kit e

centrifugação à temperatura ambiente por 1 min à 16.000 g. Ao fim do processo de extração, se obteve gDNA purificado.

4.7.1 Quantificação do gDNA

Após a extração realizada conforme o item 4.7, 2 μL do gDNA foi quantificado no espectrofotômetro NanoDrop™ Lite (Thermo Scientific, Wilmington, EUA,) utilizando absorvância de 260 nm. Além da quantificação do material genético, fornecida em $\text{ng}/\mu\text{L}$, foi também verificada a pureza do gDNA através da razão da medida de absorção dos índices 260/280nm. Razões de aproximadamente 1,8 foram consideradas como indicativo de um gDNA com um bom grau de pureza. Após a quantificação, as amostras de gDNA foram coletadas com auxílio de pipetador automático e foram estocadas a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$ até análise. A quantidade e a pureza do DNA foram utilizadas como parâmetros para a realização da qPCR.

4.8 Genotipagem dos SNPs por qPCR

As amostras de gDNA, obtidas seguindo a metodologia explicitada no item 4.7 foram diluídas em água livre de nucleases, para a concentração final de $50\text{ ng}/\mu\text{L}$. Em seguida, as amostras foram submetidas ao protocolo de Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real para genotipagem, seguindo as instruções dos fabricantes. De maneira breve, $2,5\text{ }\mu\text{L}$ das amostras diluídas de gDNA foram distribuídas em placa de 96 poços, juntamente com $1\text{ }\mu\text{L}$ de água livre de nucleases, $5,5\text{ }\mu\text{L}$ de TaqMan® Genotyping Master Mix e $0,5\text{ }\mu\text{L}$ de sonda de discriminação alélica TaqMan® SNP Genotyping específicas para cada gene avaliado (Quadro 1). As leituras das fluorescências decorrentes das ampliações por qPCR foram realizadas pelo equipamento 7500 Real-Time PCR (Applied Biosystems). Ao final das leituras, foi possível visualizar a clusterização dos genótipos existentes entre as amostras para um mesmo SNP.

Quadro 01. Identificação e caracterização dos SNPs genotipados em grupos de pacientes e controles. Gene, identificação do SNP, localização cromossômica e região gênica, tipo da troca de base e ensaio das sondas TaqMan® utilizados neste estudo.

Gene	SNP	Cromossomo / Localização	Tipo do SNP	Alelo	Assay
CCL2	rs1024611	Chr 17/ Intergênica	Substituição de transição	A>G	C__2590362_10
CXCL8	rs2227306	Chr 4/ Intragênica	Substituição de transição	C>T	C__11748169_10
TLR3	rs3775291	Chr 4/ Intragênica	Substituição de transição	C>T	C__1731425_10
TLR4	rs10759930	Chr 9/ Intergênica	Substituição de transição	C>T	C__2704045_20
TNF α	rs1799964	Chr 6/ Intragênica	Substituição de transição	T>C	C__7514871_10
IL6	rs1800795	Chr 7/ Intragênica	Substituição de transversão	G>C	C__1839697_20
IL4	rs2243250	Chr 5/ Intragênica	Substituição de transição	C>T	C__16176216_10
MICB	rs3132468	Chr 6/ Intragênica	Substituição de transição	T>C	C__9165209_10
CD209	rs2287886	Chr 19/ Intergênica	Substituição de transição	A>G	C__11515683_1_
	rs4804803	Chr 19/ Intragênica	Substituição de transição	A>G	C__1999340_10

Fonte: < <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/?term=>; < <https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>>

4.9 Diagnóstico da infecção por ZIKV

O diagnóstico das amostras obtidas conforme o item 4.6 foi realizado através de qPCR e ensaio sorológico – ELISA.

4.9.1 Diagnóstico por qPCR

Para a detecção viral por qPCR, o RNA viral foi extraído de 140 μ L de amostras de soro ou plasma usando o QIAamp Viral RNA Mini kit (QIAGEN; Hilden, Germany) de acordo com as instruções do fabricante. O qPCR foi realizado usando o Kit SuperScriptR™ III PlatinumR™ One-Step qRT-PCR System (Invitrogen™) seguindo as instruções do fabricante. A amplificação e leitura foi realizada usando o aparelho ABI 7500 (Applied Biosystems; Foster City, CA, USA). Foram consideradas positivas para ZIKV as amostras com CT \leq 38 (BRASIL, 2016).

4.9.2 Diagnóstico por sorologia - ELISA

Para a detecção de anticorpos específicos contra ZIKV foi utilizado os Kits ELISA Anti-Zika Vírus IgM (Novagnost®) e ELISA Anti-Zika Vírus IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG®) seguindo as instruções do fabricante. De maneira geral, as amostras de pacientes foram diluídas na proporção de 1:101 em tampão de amostra

disponível no kit e incubadas a 37 °C durante 1 hora. Em seguida, os poços da placa foram lavados 3 vezes com tampão de lavagem disponível no kit. Após o ciclo de lavagem, a IgG anti-humana secundária conjugada com a peroxidase foi adicionada aos poços e incubada a 37 °C por 30 minutos. Um novo ciclo de lavagem foi realizado e após, foi adicionado solução de cromogênio/substrato em cada poço da placa e incubado por 15 minutos à temperatura ambiente. A reação foi interrompida adicionando 100 µL de solução de parada. A leitura da densidade óptica foi medida em 450 nm e 630 nm usando o espectrofotômetro Epoch (BioTek®). Os resultados foram avaliados semiquantitativamente. As amostras foram categorizadas como negativas (razão < 0,8), borderline (razão $\geq 0,8$ a < 1,1) ou positiva (razão $\geq 1,1$).

4.10 Análise estatística

O teste de desvio do equilíbrio Hardy-Weinberg (EHW) foi realizado nos controles, utilizando o software GENEPOP v.4.2. (Fonte: <http://genepop.curtin.edu.au/>). As comparações das frequências alélicas e genotípicas entre os casos e controles foram realizadas através do software GraphPad Prism 7 (Graphpad software, San Diego, CA, USA). Por se tratar de um estudo de caso controle, foi aplicado o cálculo do Odds Ratio (OR), utilizando o teste de Qui-quadrado (X^2) ou o Teste Exato de Fisher. Os resultados foram avaliados considerando um intervalo de confiança (IC) de 95%, sendo os valores considerados estatisticamente significantes quando $p < 0,05$.

Para verificar as associações por meio dos testes estatísticos, foram feitas diferentes combinações de acordo com diferentes arranjos, considerando as variáveis dependentes e independentes para cada parâmetro analisado, deste modo, as diferentes variáveis foram analisadas. De forma geral, foram utilizadas como variáveis independentes: a distribuição genotípica e alélica para o gene avaliado, e características clínico-epidemiológicas; como variáveis dependentes: presença ou ausência de microcefalia associada à infecção por ZIKV, e a gravidade da microcefalia.

5 RESULTADOS

5.1 Pacientes e características clínico-epidemiológicas

As características dos pacientes incluídos neste estudo são mostradas na Tabela 01. Seguindo os critérios estabelecidos no item 4.4, foram incluídos um total de 171 indivíduos no grupo caso, sendo 70 M-MICRO, 30 P-MICRO e 71 C-MICRO e 88 indivíduos no grupo controle, sendo 44 M-ZIKVexp e 44 C-CT. A variação de idade entre as mães caso e as mães controle foi de 15 – 42 anos. Entre os pais do grupo caso, a idade variou de 18 – 53 anos. Quanto à presença de sintomatologia, a maioria das mães que compuseram o grupo caso foram sintomáticas (74.3 %), apresentando exantema (80.7 %) e febre (61.5 %) como sintomas mais frequentes.

Tabela 01. Características clínico-epidemiológicas dos indivíduos incluídos neste estudo. N/A = Não aplicável; PC = Perímetro cefálico. * Para o parâmetro ‘Classificação do PC ao nascimento’, somente foram incluídas as crianças do grupo caso das quais foi possível obter este dado (n = 59).

Características	Grupo caso		Grupo controle
	Mães (n = 70)	Pais (n = 30)	Mães (n = 44)
Total			
Idade (anos)			
Variação	15 - 40	18 - 53	16 - 42
Média	27 ± 7,0	31 ± 7,7	25 ± 7,2
Presença de sintomas			
Assintomático (%)	18 (25.7)	16 (53.3)	32 (72.7)
Sintomático (%)	52 (74.3)	14 (46.6)	12 (27.3)
Sintomatologia (% total sintomáticos)			
Febre	32 (61.5)	10 (62.5)	9 (75)
Artralgia	31 (59.6)	9 (56.2)	8 (66.7)
Exantema	42 (80.7)	4 (25)	6 (50)
Conjuntivite	4 (7.7)	2 (12.5)	0
Mialgia	26 (50)	12 (75)	6 (50)
Dor retro-orbitária	18 (34.6)	7 (43.7)	3 (25)
Linfadenopatia	6 (11.5)	4 (25)	2 (16.7)
Prurido	4 (7.7)	1 (6.2)	0
Uso de medicamentos ou suplemento durante a gestação (% total)			
Sim	38 (54.3)	N/A	32 (72.7)
Não	32 (45.7)	N/A	12 (27.3)
IgG ZIKV (%)			
Reagente	66 (94.3)	21 (70%)	15 (34.1)
Não reagente	0	7 (23.3)	25 (56.8)
Borderline	3 (4.3)	2 (6.6)	4 (9.1)
Crianças			
		Grupo caso	Grupo controle
Total		(n = 71)	(n = 44)
Gênero (%)			
Feminino		40 (56.3)	15 (34)
Masculino		31 (43.6)	29 (66)
Período de nascimento (variação mês e ano)		Jul 2015 - Mar 2017	Abr 2015 - Jul 2017
Classificação do PC ao nascimento (n =59) *			
Adequado para a idade		0	44 (100)
Microcefalia		17 (28.3)	N/A
Microcefalia grave		42 (70)	N/A

Entre as mães que foram reagentes no teste sorológico para IgG de ZIKV ($n = 85$ somados grupo caso e controle) foi encontrada uma associação entre a ocorrência de sintomas durante a gestação e o acometimento de microcefalia nas crianças (OR = 4.33; 95% IC = 1.28 – 14.89; $p = 0,014$) (Tabela 02). Analisando o uso de medicamentos ou suplementos durante a gestação nesse mesmo grupo de mães positivas para IgG de ZIKV, encontramos uma associação entre o uso de medicamentos ou suplementos e a proteção contra o nascimento de crianças com microcefalia (OR = 0,08; 95% IC = 0.010 – 0.68; $p = 0,0069$) Tabela 02.

Tabela 02 Associação entre a ocorrência de sintomas e o uso de medicamento ou suplemento com a microcefalia. M-MICRO, mães de criança com microcefalia; M-ZIKVexp+, mães de crianças saudáveis reagentes para IgG de ZIKV.

	Grupo caso	Grupo controle	OR	IC 95%	p
	M-MICRO (n = 70)	M-ZIKVexp+ (n = 15)			
Presença de sintomas (%)					
Assintomático	18 (25.7)	9 (60)	4.33	1.28 - 14.89	0.0147
Sintomático	52 (74.3)	6 (40)			
Uso de medicamentos ou suplemento durante a gestação (%)					
Sim	38 (54.3)	14 (93.33)	0.084	0.01 - 0.68	0.0069
Não	32 (45.7)	1 (6.66)			

5.2 Distribuição e comparação alélica e genotípica

As frequências alélicas e genotípicas, obtidas conforme descrito no item 4.8, de todos os grupos analisados neste estudo para os SNPs rs1024611 (CCL2), rs2227306 (CXCL8), rs3775291 (TLR3), rs10759930 (TLR4), rs1799964 (TNF α), rs1800795 (IL6), rs2243250 (IL4), rs3132468 (MICB), rs2287886 e rs4804803 (CD209) estão listadas na Tabela 03.

Tabela 03. Frequência e distribuição por grupo dos SNPs avaliados. M-MICRO, mães de criança com microcefalia; C- MICRO, crianças com microcefalia; P-MICRO, pais de crianças com microcefalia; M-ZIKV exp, mães de crianças saudáveis; C-CT, crianças saudáveis.

Frequências genotípicas e alélicas n (%)						
Gene	Grupo caso			Grupo controle		
	M-MICRO <i>n</i> = 69	C-MICRO <i>n</i> = 70	P-MICRO <i>n</i> = 30	M-ZIKVexp <i>n</i> = 42	C-CT <i>n</i> = 44	
CCL2 rs1024611	AA	29 (42.03)	35 (50)	13 (43.33)	17 (40.48)	23 (52.27)
	AG	33 (47.83)	32 (45.71)	16 (53.33)	17 (40.48)	18 (40.91)
	GG	7 (10.14)	3 (4.29)	1 (3.33)	8 (19.05)	3 (6.82)
	A	91 (65.94)	102 (72.86)	42 (70)	51 (60.71)	64 (72.73)
	G	47 (34.06)	38 (27.14)	18 (30)	33 (39.29)	24 (27.27)
CXCL8 rs2227306	CC	31 (45.59)	39 (55.71)	15 (50)	23 (53.49)	27 (61.36)
	CT	33 (48.53)	25 (35.71)	14 (46.67)	17 (39.53)	14 (31.82)
	TT	4 (5.88)	6 (8.57)	1 (3.33)	3 (6.98)	3 (6.82)
	C	95 (69.85)	103 (73.57)	44 (73.33)	63 (73.26)	68 (77.27)
	T	41 (30.15)	37 (26.43)	16 (26.67)	23 (26.74)	20 (22.73)
TLR3 rs3775291	CC	32 (47.06)	35 (50)	15 (50)	29 (67.44)	23 (53.49)
	TC	29 (42.65)	30 (42.86)	12 (40)	13 (30.23)	17 (39.53)
	TT	7 (10.29)	5 (7.14)	3 (10)	1 (2.33)	3 (6.98)
	C	93 (68.38)	100 (71.43)	42 (70)	71 (82.56)	63 (73.26)
	T	43 (31.62)	40 (28.57)	18 (30)	15 (17.44)	23 (26.74)
TLR4 rs10759930	CC	30 (44.12)	29 (41.43)	14 (46.67)	16 (37.21)	19 (43.18)
	CT	32 (47.06)	36 (51.43)	15 (50)	23 (53.49)	20 (45.45)
	TT	6 (8.82)	5 (7.14)	1 (3.33)	4 (9.30)	5 (11.36)
	C	92 (67.65)	94 (67.14)	43 (71.67)	55 (63.95)	58 (65.91)
	T	44 (32.35)	46 (32.86)	17 (28.33)	31 (36.05)	30 (34.09)
TNF α rs1799964	TT	34 (50)	39 (55.71)	19 (63.33)	26 (60.47)	25 (56.82)
	TC	28 (41.18)	27 (38.57)	9 (30)	15 (34.88)	18 (40.91)
	CC	6 (8.82)	4 (5.71)	2 (6.67)	2 (4.65)	1 (2.27)
	T	96 (70.59)	105 (75)	47 (78.33)	67 (77.91)	68 (77.27)
	C	40 (29.41)	35 (25)	13 (21.67)	19 (22.09)	20 (22.73)

(continua)

(continua)

Frequências genotípicas e alélicas n (%)						
Gene	Grupo caso			Grupo controle		
	M-MICRO	C-MICRO	P-MICRO	M-ZIKVexp	C-CT	
IL6 rs1800795		<i>n</i> = 68	<i>n</i> = 70	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 42	<i>n</i> = 44
	GG	43 (63.24)	46 (65.71)	16 (53.33)	25 (59.52)	29 (65.91)
	GC	23 (33.82)	21 (30)	14 (46.67)	15 (35.71)	13 (29.55)
	CC	2 (2.94)	3 (4.29)	0	2 (4.76)	2 (4.55)
	G	109 (80.15)	113 (80.71)	46 (76.67)	65 (77.38)	71 (80.68)
	C	27 (19.85)	27 (19.29)	14 (23.33)	19 (22.62)	17 (19.32)
IL4 rs2243250		<i>n</i> = 69	<i>n</i> = 70	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 43	<i>n</i> = 44
	CC	36 (52.17)	37 (52.86)	17 (56.67)	16 (37.21)	16 (36.36)
	CT	24 (34.78)	24 (34.29)	10 (33.33)	17 (39.53)	20 (45.45)
	TT	9 (13.04)	9 (12.86)	3 (10)	10 (23.26)	8 (18.18)
	C	96 (69.57)	98 (70)	44 (73.33)	49 (56.98)	52 (59.09)
	T	42 (30.43)	42 (30)	16 (26.67)	37 (43.02)	36 (49.91)
MICB rs3132468		<i>n</i> = 69	<i>n</i> = 70	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 43	<i>n</i> = 44
	TT	49 (71.01)	48 (68.57)	19 (65.52)	35 (81.40)	36 (81.82)
	TC	19 (27.54)	17 (24.29)	9 (31.03)	6 (13.95)	7 (15.91)
	CC	1 (1.45)	5 (7.14)	1 (3.45)	2 (4.65)	1 (2.27)
	T	117 (84.78)	113 (80.71)	47 (81.03)	76 (88.37)	79 (89.77)
	C	21 (15.22)	27 (19.29)	11 (18.97)	10 (11.63)	9 (10.23)
CD209 rs2287886		<i>n</i> = 68	<i>n</i> = 70	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 43	<i>n</i> = 44
	GG	33 (48.53)	39 (55.71)	17 (56.67)	23 (53.49)	21 (47.73)
	AG	29 (42.65)	26 (37.14)	11 (36.67)	16 (37.21)	20 (45.45)
	AA	6 (8.82)	5 (7.14)	2 (6.67)	4 (9.30)	3 (6.82)
	G	95 (69.85)	104 (74.29)	45 (75)	62 (72.09)	62 (70.45)
	A	41 (30.15)	36 (25.71)	15 (25)	24 (27.91)	26 (29.55)
CD209 rs4804803		<i>n</i> = 68	<i>n</i> = 70	<i>n</i> = 30	<i>n</i> = 43	<i>n</i> = 44
	AA	37 (54.41)	39 (55.71)	17 (56.67)	20 (46.51)	19 (43.18)
	AG	22 (32.35)	26 (37.14)	12 (40)	17 (39.53)	21 (47.73)
	GG	9 (13.24)	5 (7.14)	1 (3.33)	6 (13.95)	4 (9.09)
	A	96 (70.59)	104 (74.29)	46 (76.67)	57 (66.28)	59 (67.05)
	G	40 (29.41)	36 (25.71)	14 (23.33)	29 (33.72)	29 (32.95)

O teste de EHW não mostrou nenhum desvio de equilíbrio na população controle para os SNPs analisados (Tabela 04).

Tabela 04. Teste de EHW na população controle para os SNPs estudados. χ^2 = Teste Qui-quadrado. A população está em EHW ($p > 0,025$) quanto à distribuição alélica e genotípica para todos os SNPs analisados.

Gene	SNP	Grupo controle	
		χ^2	<i>p</i>
CCL2	rs1024611	4.80	0.64
CXCL8	rs2227306	6.10	0.59
TLR3	rs3775291	0.50	1.0
TLR4	rs10759930	5.52	0.66
TNF α	rs1799964	2.85	0.38
IL6	rs1800795	2.81	1.0
IL4	rs2243250	12.29	0.40
MICB	rs3132468	9.49	0.04
CD209	rs2287886	1.0	0.54
CD209	rs4804803	3.66	1.00

A avaliação da associação entre os grupos através do teste χ^2 ou teste Exato de Fisher realizada não encontrou diferenças entre as frequências alélicas para os SNPs analisados nos genes CCL2, CXCL8, TLR4, TNF α , IL6, IL4, MICB e CD209, quando comparadas entre **M-MICRO versus (vs) M-ZIKVexp**: CCL2 (OR = 1.25; 95% IC = 0.728 – 2.22; $p = 0.47$), CXCL8 (OR = 0.84; 95% IC = 0.466 – 1.533; $p = 0.64$), TLR4 (OR = 1.17; 95% IC = 0.674 – 2.11; $p = 0.66$), TNF α (OR = 0.68; 95% IC = 0.370 – 1.287; $p = 0.27$), IL6 (OR = 1.18; 95% IC = 0.608 – 2.314; $p = 0.73$), IL4 (OR = 1.72; 95% IC = 0.972 – 3.072; $p = 0.062$), MICB (OR = 0.73; 95% IC = 0.336 – 1.607; $p = 0.55$), CD209 rs2287886 (OR = 0.89; 95% IC = 0.501 – 1.613; $p = 0.76$), CD209 rs4804803 (OR = 1.22; 95% IC = 0.681– 2.144; $p = 0.55$); e **C-MICRO vs C-CT**: CCL2 (OR = 1.00; 95% IC = 0.560 – 1.822; $p = >0.99$), CXCL8 (OR = 0.81; 95% IC = 0.466 – 1.544; $p = 0.63$), TLR4 (OR = 1.05; 95% IC = 0.607 – 1.874; $p = 0.88$), TNF α (OR = 0.88; 95% IC = 0.482 – 1.682; $p = 0.75$), IL6 (OR = 1.00; 95% IC = 0.493 – 2; $p = >0.9$), IL4 (OR = 1.61; 95% IC = 0.912 – 2.857; $p = 0.11$), MICB (OR = 0.47; 95% IC = 0.206 – 1.083; $p = 0.09$), CD209 rs2287886 (OR = 1.21; 95% IC = 0.675 – 2.187; $p = 0.54$), CD209 rs4804803 (OR = 1.42; 95% IC = 0.787– 2.524; $p = 0.29$);

Não foram encontradas associações entre as frequências alélicas e genotípicas dos SNPs avaliados e o aparecimento ou gravidade de sintomatologia entre o grupo M-MICRO sintomáticas vs M-MICRO assintomáticas.

5.2.1 Associação alélica e genotípica para TLR3 rs3775291

A comparação das frequências alélicas e genotípicas do SNP rs3775291 (TLR3) mostrou diferenças entre os grupos analisados (Tabela 05). O alelo T para este SNP foi mais frequente e associado às mães que tiveram crianças com microcefalia (M-MICRO) quando este grupo foi comparado ao grupo de mães controle M-ZIKVexp (OR = 2.19; 95% IC = 1.2 – 4.2; p = 0,01). Essa associação se manteve mesmo com a estratificação do grupo de mães controle em mães com sorologia positiva para IgG de ZIKV (M-ZIKVexp+) que reduziu a amostra para 15 mães (OR = 3.00; 95% IC = 1.0 – 8.3; p = 0.04).

Na comparação dos genótipos com presença de pelo menos um alelo T (TT + TC vs CC) a associação entre o grupo M-MICRO e o grupo M-ZIKVexp foi mantida (OR = 2.33; 95% IC = 1.1 – 5.2; p = 0.04). Também encontramos associação do alelo T com o grupo caso quando adicionamos o grupo de pais de crianças com microcefalia (P-MICRO) ao grupo M-MICRO e comparamos com o grupo de M-ZIKVexp. Com este arranjo, foi encontrada associação quanto à frequência do alelo T (OR = 2.16; 95% IC = 1.15 – 4.0; p = 0.01) e a frequência do genótipo com presença de pelo menos um alelo T (TT + TC vs CC), (OR = 2.21; 95% IC = 1.0 – 4.6; p = 0.04).

Não foram encontradas diferenças significativas entre o grupo caso de crianças com microcefalia (C-MICRO) e crianças controle (C-CT), quanto às frequências alélicas (OR = 0.91; 95% IC = 0.503 – 1.656; p = 0.87) e genotípicas, com a presença de pelo menos um alelo T (TT + TC vs CC), (OR = 0.15; 95% IC = 0.542 – 2.477; p = 0.84).

Tabela 05. Frequência e distribuição alélica e genotípica do TLR3 rs3775291 e sua associação com microcefalia causada por ZIKV. OR, Odds ratio; IC, intervalo de confiança; M-MICRO, mães de criança com microcefalia; M-ZIKVexp, mães de crianças saudáveis; M-ZIKVexp+, mães de crianças saudáveis reagentes para IgG de ZIKV; P-MICRO+, pais de crianças com microcefalia reagentes para IgG ZIKV.

		Comparação entre os grupos n (%)		Alelo/ genótipo	OR	95% IC	p	
	Grupo caso	Grupo controle						
	M-MICRO n = 68	M-ZIKVexp n = 43						
C	93 (68.38)	71 (82.56)	T vs. C	2.19	1.158 - 4.148	0.019		
T	43 (31.62)	15 (17.44)						
	M-MICRO n = 68	M-ZIKVexp+ n = 15						
C	93 (68.38)	26 (86.66)	T vs C	3.00	1.008 - 8.367	0.046		
T	43 (31.62)	4 (13.33)						
	M-MICRO n = 68	M-ZIKVexp n = 43						
CC	32 (47.06)	29 (67.44)	TT+TC vs CC	2.33	1.058 - 5.155	0.049		
CT	29 (42.65)	13 (30.23)						
TT	7 (10.29)	1 (2.33)						
	M- MICRO n = 68	M-ZIKVexp+ n = 15						
CC	32 (47.06)	11 (73.33)	TT+TC vs CC	3.1	0.916- 9.434	0.088		
CT	29 (42.65)	4 (26.66)						
TT	7 (10.29)	0						
	M-MICRO n = 68	P- MICRO+ n = 23	M-ZIKVexp n = 43					
C	93 (68.38)	32 (69.5)	71 (82.56)	T vs C	2.16	1.154 - 4.009	0.018	
T	43 (31.62)	14 (30.4)	15 (17.44)					
	M-MICRO n = 68	P-MICRO+ n = 23	M-ZIKVexp n = 43					
CC	32 (47.06)	12 (52.2)	29 (67.44)	TT+TC vs CC	2.21	1.011 - 4.57	0.042	
CT	29 (42.65)	8 (34.8)	13 (30.23)					
TT	7 (10.29)	3 (13)	1 (2.33)					

5.2.2 Associação entre as frequências alélicas do TNF α rs1799964 com a gravidade da microcefalia

Estratificando o grupo caso de crianças (M-MICRO) pela gravidade da microcefalia, em crianças com microcefalia grave (CMG) e crianças com microcefalia (CM), foi encontrada

associação entre a presença do alelo T para o SNP rs1799964 no grupo de crianças com microcefalia grave (OR = 2.63; 95% IC = 1.13 – 6.21; $p = 0.03$) (Tabela 06).

Associações significativas para os outros SNPs avaliados não foram encontradas (Tabela 06).

Tabela 06. Associação alélica dos SNPs avaliados com a gravidade da microcefalia. OR, Odds ratio; IC, intervalo de confiança; CMG, crianças com microcefalia grave; CM, crianças com microcefalia.

		Frequências alélicas n (%)		Alelo	OR	95% IC	<i>p</i>
		Grupo caso					
		CMG <i>n</i> = 42	CM <i>n</i> = 17				
CCL2 rs1024611	A	61 (72.62)	23 (67.65)	A vs. G	0.64	0.23 - 1.8	0.47
	G	23 (27.38)	11 (32.35)				
CXCL8 rs2227306	C	65 (77.38)	23 (67.65)	C vs T	1.63	0.68 - 3.97	0.35
	T	19 (22.62)	11 (32.35)				
TLR3 rs3775291	C	61 (72.62)	26 (76.47)	C vs T	0.81	0.32 - 2.04	0.81
	T	23 (27.38)	8 (23.53)				
TLR4 rs10759930	C	59 (70.24)	20 (58.82)	C vs T	1.65	0.71 - 3.65	0.28
	T	25 (29.76)	14 (41.18)				
TNF α rs1799964	T	68 (80.95)	21 (61.76)	T vs C	2.63	1.13 - 6.21	0.03
	C	16 (19.05)	13 (38.24)				
IL6 rs1800795	G	68 (80.95)	28 (82.35)	G vs C	0.91	0.32 - 2.47	>0.9999
	C	16 (19.05)	6 (17.65)				
IL4 rs2243250	C	56 (66.67)	28 (82.35)	C vs T	0.42	0.16 - 1.14	0.11
	T	28 (33.33)	6 (17.65)				
MICB rs3132468	T	63 (75)	28 (82.35)	T vs C	0.64	0.23 - 1.81	0.47
	C	21 (25)	6 (17.65)				
CD209 rs2287886	G	62 (73.81)	29 (85.29)	G vs A	0.48	0.18 - 1.31	0.22
	A	22 (26.19)	5 (14.71)				
CD209 rs4804803	A	63 (75)	21 (61.76)	A vs G	1.85	0.75 - 4.28	0.18
	G	21 (25)	13 (38.24)				

6 DISCUSSÃO

Frente ao grave problema de saúde pública advindo das infecções por ZIKV, a busca pelo entendimento dos fatores do hospedeiro que podem modular as infecções, interferindo em seu desfecho, são imprescindíveis. Apesar de avanços na elucidação da imunopatogênese desencadeada pela infecção por ZIKV, há dificuldades em entender os mecanismos de doença durante a sua ocorrência, pela possibilidade dos achados encontrados serem causa ou consequência desta, principalmente na microcefalia, que os fatores patológicos ocorrem intraútero, quando não é possível ter acesso aos eventos imunológicos que ocorrem durante a agressão do SNC do concepto. Estudos genéticos, como o presente estudo, constituem uma importante ferramenta para elucidar o papel da RI do hospedeiro diante a infecção por um patógeno, antes da ocorrência da doença, identificando genes de proteção ou susceptibilidade para os diversos fenótipos. A exemplo de doenças multigênicas, há evidências de que fatores genéticos do hospedeiro têm interferência na resposta imune ao ZIKV (CAIRES-JÚNIOR; GOULART; MELO; et al., 2018).

Neste estudo, foi encontrada associação entre o SNP rs3775291 no gene TLR3 em mães infectadas por ZIKV durante a gestação, com a ocorrência de microcefalia decorrente da SCZ em crianças e a associação do SNP rs1799964 no gene TNF α em crianças com a microcefalia grave.

A ativação do gene TLR3 desencadeia resposta imune antiviral através da produção dos IFN-1 e da produção de citocinas pró-inflamatórias. Os produtos da ativação do TLR3 são importantes no curso das infecções por ZIKV. Os IFN-1 constituem a principal resposta contra a infecção por ZIKV em células da placenta humana (BAYER; LENNEMANN; OUYANG; et al., 2016) e além disso, modelos *in vitro* demonstram que o aumento da ativação do TLR3 leva a uma desregulação da neurogênese e desencadeia vias de apoptose durante a infecção por ZIKV (DANG; TIWARI; LICHINCHI; et al., 2016). Ainda, os IFN-1 são importantes na manutenção da barreira hematoencefálica, que protege o cérebro da passagem do vírus ou de produtos lesivos ao cérebro (VELDHUIS; FLORIS; VAN DER MEIDE; et al., 2003; VARATHARAJ; GALEA, 2017).

O SNP rs3775291 no TLR3 é uma variante intragênica e *missense* que leva a mudança da Leucina pela Fenilalanina (Leu412Phe) e alguns estudos de genética populacional têm mostrado influências deste SNP na susceptibilidade a infecções virais, mas seu papel ainda não é definido. A presença do alelo T foi associada a proteção contra a ocorrência de dengue hemorrágica (ALAGARASU; BACHAL; MEMANE; et al., 2015) e a

encefalite transmitida por carrapatos (KINDBERG; VENE; MICKIENE; et al., 2011). Sironi, Biasin, Cagliani et al. (2012) mostraram que o genótipo homozigoto para o alelo T no SNP rs3775291 conseguiu controlar a replicação viral quando comparado com o genótipo homozigoto para o alelo C em infecção *in vitro* de células mononucleares com HIV-1. O mesmo estudo mostrou que células com pelo menos um alelo T para este SNP produzem altos níveis de citocinas pró-inflamatórias quando comparadas com células homozigotas para o alelo C. Contudo, os achados do presente estudo mostram a associação do alelo T como fator de risco para a SCZ, que é o desfecho mais grave advindo da infecção por ZIKV. Os dados apresentados aqui demonstram que esta variação genética no gene TLR3 em mulheres grávidas pode influenciar o risco de desenvolvimento de SCZ em seus bebês e reforçam a importância desta via para o controle da infecção por ZIKV. Corroborando neste sentido, um estudo recente mostrou que a presença de pelo menos um alelo T no genótipo foi associada ao aumento do risco de infecções por CMV em crianças (STUDZIŃSKA; JABŁOŃSKA; WIŚNIEWSKA-LIGIER; et al., 2017).

Quanto à funcionalidade, existem resultados contraditórios no que se refere ao efeito de rs3775291 na expressão de TLR3. Estudos funcionais *in vitro* demonstram que o alelo T leva à produção de TLR3 com função diminuída. Apesar de não encontrar diferenças entre os alelos quanto aos níveis de RNA mensageiro (mRNA), níveis de expressão da proteína e na expressão da proteína TLR3 na membrana, foi demonstrado, por meio de ensaio de deslocamento de mobilidade eletroforética reversa, que o TLR3 contendo fenilalanina liga menor quantidade de dsRNA em comparação com o TLR3 contendo a leucina. Este mesmo estudo mostra, através de ensaios baseados em luciferase dupla, que o TLR3 contendo a fenilalanina reduz a ativação da via NFκB em cerca de 50% em comparação com o TLR3 contendo leucina (ZHOU; FAN; YU; et al., 2011). A função diminuída da proteína do TLR3 contendo a fenilalanina é ainda corroborada pela previsão de que o SNP rs3775291 tem um efeito possivelmente prejudicial na estrutura da proteína. Logo, é possível que o rs3775291 possa estar associado à diminuição da inflamação. Assim, a diferença genética encontrada no presente estudo pode ser um fator que influencia a diminuição da inflamação através da modulação da RI inata, levando a uma menor ativação das vias desencadeadas pelo TLR3 nas mães que tiveram crianças com microcefalia, sugerindo que a diminuição da ativação desta via inflamatória comprometa o controle da infecção pelo ZIKV nas mães e, por conta disso, seja um fator importante na indução de danos neurológicos no feto, que são fatores contributivos para a SCZ.

A associação do alelo T no SNP rs1799964 TNF α com a gravidade da microcefalia também sugere o envolvimento da resposta inflamatória atenuada, prejudicando a defesa antiviral. Sendo assim, é possível que a defesa antiviral menor no feto predisponha à invasão do SNC pelo ZIKV e possa ser um agravante do quadro neurológico desencadeado pela infecção congênita por ZIKV, por conta do perfil desta citocina. O TNF α atua como citocina pró-inflamatória multifuncional, possuindo importante papel na ativação de linfócitos tanto na RI inata quanto na RI adaptativa. A ativação e retroalimentação positiva exercida pelo TNF α nas células NK são um importante mecanismo de controle de infecções virais pela RI inata. Dessa forma, uma produção mais baixa dessa citocina pode ser um fator contributivo para o aumento da infecção por ZIKV, que pode levar à microcefalia grave. A presença do alelo T para esse SNP no gene TNF α tem sido associada com a diminuição da expressão dessa citocina quando comparada ao alelo mutante (KAMIZONO; YAMADA; KIMURA; et al., 1998) e um estudo recente mostrou a associação do genótipo TC para este SNP com infecção congênita por CMV (KASZTELEWICZ; CZECH-KOWALSKA; LIPKA; et al., 2017).

Apesar de serem genes envolvidos na RI a infecções virais e implicados na susceptibilidade a infecções, não foram encontradas diferenças nas frequências genotípicas e alélicas entre os grupos que compuseram a população deste estudo, nos SNPs nos genes CCL2, CXCL8, TLR4, IL6, IL4, MICB e CD209, para nenhuma das análises realizadas. Esse fato não afasta que haja influência destes SNPs na patogênese desencadeada pelo ZIKV, pois, a associação negativa pode ser devido ao número limitado da amostra, afetando o poder do estudo.

Quanto às características epidemiológicas encontradas nas populações que compuseram este estudo, a presença de exantema e febre como principal sintoma relatado pelo grupo M-MICRO bem como a alta frequência de mães sintomáticas neste grupo condiz com o perfil descrito na literatura para as infecções por ZIKV (BRASIL; PEREIRA; MOREIRA; et al., 2016) e corrobora com a associação encontrada no presente trabalho entre a presença de sintomatologia nas mães e o acometimento de microcefalia nas crianças. Apesar disto, não foram encontradas associações entre as frequências alélicas e genotípicas nos SNPs estudados aqui e o aparecimento de sintomas.

A associação entre o uso de algum medicamento ou suplemento com a proteção contra microcefalia encontrada neste estudo pode ser um indicativo de que um maior cuidado básico durante a gestação, como a realização do pré-natal ou a procura por atendimento médico por conta da presença de sintomatologia durante da infecção por ZIKV, sejam fatores importantes para o controle da infecção por ZIKV. Corroborando com nossos achados, um estudo recente

aponta que fatores ligados à baixa renda e falta de instrução, como baixa escolaridade materna e o consumo de drogas lícitas, como fumo e álcool, estão associados à prevalência de microcefalia antes do surto endêmico no país por ZIKV (SILVA; BARBIERI; ALVES; et al., 2016). Assim, a intervenção medicamentosa no grupo controle traz evidências de que os fatores relacionados à atenção básica de saúde podem diminuir o aumento do risco de ocorrência de malformações congênitas que têm a infecção por ZIKV como causa.

Os achados descritos aqui, sugerem que a genética materna pode influenciar o risco da ocorrência de SCZ e que a genética das crianças acometidas com a SCZ está associada a gravidade da síndrome, colocando os genes TLR3 e TNF α como genes promissores para futuros estudos funcionais, para melhor entendimento dos seus respectivos papéis na imunopatogênese do ZIKV e como possíveis alvos candidatos para imunoterapias contra este patógeno.

7 CONCLUSÃO

A partir do presente estudo pode-se concluir que:

- A presença do alelo T no SNP rs3775291 no TLR3, em mães infectadas por ZIKV durante a gestação está associada ao desfecho de microcefalia nos bebês;
- A presença do alelo T no SNP rs1799964 TNF α nas crianças com microcefalia está associada com microcefalia grave nesta população;
- O uso de medicamentos ou suplementos está associado à proteção da ocorrência de microcefalia em mães IgG positivas para ZIKV;
- A presença de sintomas clínicos nas mães está associada à ocorrência de microcefalia em mães IgG positivas para ZIKV.

8 PERSPECTIVAS

1. Realizar estudos funcionais para confirmar a influência desses polimorfismos na produção desses produtos gênicos e na ativação das vias estimuladas por eles;
2. Avaliar o efeito desses polimorfismos na infecção *in vitro* pelo ZIKV, utilizando modelos experimentais ou *in vitro* de microcefalia;
3. Estudar outros polimorfismos nessas vias de ativação mediadas pelos polimorfismos do TLR3 e do TNF α .

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ACOSTA-AMPUDIA, Y.; MONSALVE, D. M.; CASTILLO-MEDINA, L. F.; et al. Autoimmune Neurological Conditions Associated With Zika Virus Infection. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, v. 11, n. April, 2018. Disponível em: <<http://journal.frontiersin.org/article/10.3389/fnmol.2018.00116/full>>.
- ALAGARASU, K.; DAMLE, I. M.; BACHAL, R. V.; et al. Infection , Genetics and Evolution Association of promoter region polymorphisms of CD209 gene with clinical outcomes of dengue virus infection in Western India. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 17, p. 239–242, 2013. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2013.04.024>>.
- ALAGARASU, K.; BACHAL, R. V.; MEMANE, R. S.; et al. Polymorphisms in RNA sensing toll like receptor genes and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 220, n. 1, p. 164–168, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imbio.2014.09.020>>.
- ALAGARASU, K.; BACHAL, R. V.; DAMLE, I.; et al. Association of FCGR2A p.R131H and CCL2 c.-2518 A>G gene variants with thrombocytopenia in patients with dengue virus infection. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 819–822, 2015. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.humimm.2015.09.042>>.
- ALBERTS, JOHNSON, LEWINS, et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ARAGÃO, M.F.V.; LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, A. M. at al. Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. **Bmj**, v. 353, p. i1901, 2016. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27075009>>.
- BACKOVIC, M.; REY, F. A. Virus entry : old viruses , new receptors. **Current Opinion in Virology**, v. 2, n. 1, p. 4–13, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.coviro.2011.12.005>>.
- BARKHASH, A. V.; PERELYGIN, A. A.; BABENKO, V. N.; et al. Single nucleotide polymorphism in the promoter region of the CD209 gene is associated with human predisposition to severe forms of tick-borne encephalitis. **Antiviral Research**, v. 93, n. 1, p. 64–68, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2011.10.017>>.
- BAYER, A.; LENNEMANN, N. J.; OUYANG, Y.; et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.03.008>>.
- BENAKANAKERE, M. R.; FINOTI, L. S.; TANAKA, U.; et al. Investigation of the functional role of human Interleukin-8 gene haplotypes by CRISPR / Cas9 mediated genome editing. **Scientific Reports**, n. July, p. 1–11, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/srep31180>>.

- BRANDÃO, L. A. C.; CROVELLA, S. Original article Antiretroviral therapy immunologic non-response in a Brazilian population : association study using pharmaco- and immunogenetic markers. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, n. x x, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.09.002>>.
- BRASIL. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC). Emergência de Saúde Pública de Importância Internacional- ESPII. **Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde**, v. 2, 2016.
- BRASIL. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 30 de 2018. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**, v. 49, n. Tabela 1, p. 1–14, 2018a.
- BRASIL. Monitoramento integrado de alterações no crescimento e desenvolvimento relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, até a Semana Epidemiológica 20 de 2018. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**, v. 49, n. 29, p. 1–8, 2018b.
- BRASIL, P.; PEREIRA, J. P.; MOREIRA, M. E.; et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602412>>. Acesso em: 25 nov. 2018.
- CAIRES-JÚNIOR, L. C.; GOULART, E.; MELO, U. S.; et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, p. 1–11, 2018.
- CAO-LORMEAU, VAN MAI; ROCHE, CLAUDINE; TEISSIER, A. et al. RE: Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. **Emerging Infectious Diseases**, v. 20, n. 11, p. 1960, 2014.
- CAO-LORMEAU, V. M.; BLAKE, A.; MONS, S.; et al. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1531–1539, 2016.
- CARRILLO-HERNÁNDEZ, M. Y.; RUIZ-SAENZ, J.; VILLAMIZAR, L. J.; et al. Co-circulation and simultaneous co-infection of dengue, chikungunya, and zika viruses in patients with febrile syndrome at the Colombian-Venezuelan border. **BMC Infectious Diseases**, v. 18, n. 1, p. 1–12, 2018.
- CASANOVA, J.-L.; ABEL, L. GENETIC DISSECTION OF IMMUNITY TO MYCOBACTERIA: The Human Model. **Annual Review of Immunology**, v. 20, n. 1, p. 581–620, 2002. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.immunol.20.081501.125851>>.
- CHUANSUMRIT, A.; SAKUNTABHAI, A.; TURBPAIBOON, C.; et al. A variant in the CD209 promoter is associated with severity of dengue disease. **Nature Genetics**, v. 37, n. 5, p. 507–513, 2005.
- CUGOLA, F. R.; FERNANDES, I. R.; RUSSO, F. B.; et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, v. 534, n. 7606, p. 267–271, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/nature18296>>.
- DANG, J.; TIWARI, S. K.; LICHINCHI, G.; et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in

Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014>>.

DETTOGNI, R. S.; TRISTÃO-SÁ, R.; DOS SANTOS, M.; et al. Single nucleotide polymorphisms in immune system genes and their association with clinical symptoms persistence in dengue-infected persons. **Human Immunology**, v. 76, n. 10, p. 717–723, 2015.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus (I). Isolations and Serological Specificity. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene.**, v. 46, n. 5, p. 509–520, 1952.

DUARTE DOS SANTOS, C. N.; GOLDENBERG, S. Zika Virus and Microcephaly: Challenges for a Long-Term Agenda. **Trends in Parasitology**, v. 32, n. 7, p. 508–511, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.008>>.

DUFFY, M. R.; CHEN, T.-H. T.-H.; HANCOCK, W. T.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **The New England Journal of Medicine**, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, 2009. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19516034>><<http://www.nejm.org/doi/abs/10.1056/NEJMoa0805715>>.

ELONG NGONO, A.; VIZCARRA, E. A.; TANG, W. W.; et al. Mapping and Role of the CD8+ T Cell Response During Primary Zika Virus Infection in Mice. **Cell Host and Microbe**, v. 21, n. 1, p. 35–46, 2017. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2016.12.010>>.

FANG, X.; HU, Z.; SHANG, W.; et al. Genetic polymorphisms of molecules involved in host immune response to dengue virus infection. **FEMS Immunology and Medical Microbiology**, v. 66, n. 2, p. 134–146, 2012.

FISHMAN, D.; FAULDS, G.; JEFFEY, R.; et al. The effect of novel polymorphisms in the interleukin-6 (IL-6) gene on IL-6 transcription and plasma IL-6 levels, and an association with systemic-onset juvenile chronic arthritis. **Journal of Clinical Investigation**, v. 102, n. 7, p. 1369–1376, 1998.

FOO, S.-S.; CHEN, W.; CHAN, Y.; et al. Biomarkers and immunoprofiles associated with fetal abnormalities of ZIKV-positive pregnancies. **JCI Insight**, v. 3, n. 21, 2 nov. 2018. Disponível em: <<https://insight.jci.org/articles/view/124152>>. Acesso em: 12 nov. 2018.

GAO, Q.; XIE, J.; WANG, L.; et al. Interaction effects among IFN- γ + 874 , IL-polymorphisms on the clinical progression of subjects infected with hepatitis B virus and / or hepatitis C virus : a retrospective nested case – control study. **Bmj Open**, v. 2, p. 1–7, 2017.

GARCÍA, G.; DEL PUERTO, F.; PÉREZ, A. B.; et al. Association of MICA and MICB alleles with symptomatic dengue infection. **Human Immunology**, v. 72, n. 10, p. 904–907, 2011.

GOODFELLOW, F. T. T.; WILLARD, K. A. A.; WU, X.; et al. Strain-Dependent Consequences of Zika Virus Infection and Differential Impact on Neural Development. **Viruses**, v. 10, n. 10, p. 550, 9 out. 2018. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/1999-4915/10/10/550>>. Acesso em: 17 out. 2018.

GRANT, A.; PONIA, S. S.; TRIPATHI, S.; et al. Zika Virus Targets Human STAT2 to

- Inhibit Type I Interferon Signaling. **Cell Host and Microbe**, v. 19, n. 6, p. 882–890, 2016.
- HADDOW, A. D.; SCHUH, A. J.; YASUDA, C. Y.; et al. Genetic characterization of Zika virus strains: Geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 6, n. 2, 2012.
- HARALAMBIEVA, I. H.; LAMBERT, N. D.; OVSYANNIKOVA, I. G.; et al. Associations between single nucleotide polymorphisms in cellular viral receptors and attachment factor-related genes and humoral immunity to rubella vaccination. **PLoS ONE**, v. 9, n. 6, 2014.
- HASAN, S. S.; SEVVANA, M.; KUHN, R. J.; et al. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. **Nature Structural and Molecular Biology**, v. 25, n. 1, p. 13–20, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41594-017-0010-8>>.
- HUANG, Y.; LEI, H.; LIU, H.; et al. DENGUE VIRUS INFECTS HUMAN ENDOTHELIAL CELLS AND INDUCES IL-6 AND IL-8 PRODUCTION. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 63, p. 71–75, 2000.
- IOOS, S.; MALLET, H. P.; LEPARC GOFFART, I.; et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.medmal.2014.04.008>>.
- KAM, Y. W.; LEITE, J. A.; LUM, F. M.; et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017.
- KAMIZONO, S.; YAMADA, A.; KIMURA, A.; et al. Polymorphism of the 5' flanking region of the human tumor necrosis factor TNF- α gene in Japanese - Higuchi. **Tissue Antigens**, v. 51, p. 605–612, 1998.
- KASZTELEWICZ, B.; CZECH-KOWALSKA, J.; LIPKA, B.; et al. Cytokine gene polymorphism associations with congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 36, n. 10, p. 1811–1818, 2017.
- KHOR, C. C.; CHAU, T. N. B.; PANG, J.; et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. **Nature Genetics**, v. 43, n. 11, p. 1139–1141, 2011.
- KINDBERG, E.; VENE, S.; MICKIENE, A.; et al. A functional Toll-like receptor 3 gene (TLR3) may be a risk factor for tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection. **Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 4, p. 523–528, 2011.
- LANCIOTTI, R. S.; LAMBERT, A. J.; HOLODNIY, M.; et al. Phylogeny of Zika virus in western Hemisphere, 2015. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 5, p. 933–935, 2016.
- LUCCHESI, G.; KANDUC, D.; G., L. Zika virus and autoimmunity: From microcephaly to Guillain-Barre syndrome, and beyond. **Autoimmunity reviews**, v. 15, n. 8, p. 801–808, 2016. Disponível em: <<http://www.elsevier.com/locate/autrev%5Cnhttp://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=emed18b&NEWS=N&AN=609945855>>.
- LUZ, K. G.; SANTOS, G. I. V. dos; VIEIRA, R. de M. Febre pelo vírus Zika. **Epidemiologia**

- e **Serviços de Saúde**, v. 24, n. 4, p. 785–788, 2015. Disponível em: <http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742015000400021&scielo=S2237-96222015000400785>.
- MACNAMARA, F. N. Zika virus: A report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 48, n. 2, p. 139–145, 1954.
- MCLAREN, P. J.; CARRINGTON, M. The impact of host genetic variation on infection with HIV-1. **Nature Immunology**, v. 16, n. 6, p. 577–583, 2015.
- MEZGER, M.; STEFFENS, M.; SEMMLER, C.; et al. Investigation of promoter variations in dendritic cell-specific ICAM3-grabbing non-integrin (DC-SIGN) (CD209) and their relevance for human cytomegalovirus reactivation and disease after allogeneic stem-cell transplantation. 2007.
- MINER, J. J.; CAO, B.; GOVERO, J.; et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. **Cell**, v. 165, n. 5, p. 1081–1091, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cell.2016.05.008>>.
- MUSSO, D.; ROCHE, C.; ROBIN, E.; et al. Potential sexual transmission of zika virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359–361, 2015.
- NETTO, E. M.; MOREIRA-SOTO, A.; PEDROSO, C.; et al. crossm High Zika Virus Seroprevalence in Salvador , Northeastern Brazil Limits the. **mBio**, v. 8, n. 6, p. 1–14, 2017.
- PETERSEN, E.; WILSON, M. E.; TOUCH, S.; et al. Rapid Spread of Zika Virus in The Americas - Implications for Public Health Preparedness for Mass Gatherings at the 2016 Brazil Olympic Games. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 44, n. May 2015, p. 11–15, 2016. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.ijid.2016.02.001>>.
- PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **The new engl and journal of medicine**, v. 64, n. October 2016, p. 396, 2016.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. **Nature**, v. 560, n. 7720, p. 573–581, 2018. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41586-018-0446-y>>.
- PLATT, D. J.; SMITH, A. M.; ARORA, N.; 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.
- RIBEIRO, L. S.; MARQUES, R. E.; JESUS, A. M. R. De; et al. Zika crisis in Brazil: Challenges in research and development. **Current Opinion in Virology**, v. 18, n. May, p. 76–81, 2016.
- ROGERS, T. F.; GOODWIN, E. C.; BRINEY, B.; et al. Zika virus activates de novo and cross-reactive memory B cell responses in dengue-experienced donors. **Science Immunology**, v. 2, n. 14, p. eaan6809, 2017. Disponível em: <<http://immunology.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/sciimmunol.aan6809>>.
- ROSSI, D.; FAUCZ, F. R.; MELO, A.; et al. Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. **Journal of Internal Medicine**, p. 1–8, 2018.

- ROVIN, B. H.; LU, L.; SAXENA, R. A Novel Polymorphism in the MCP-1 Gene Regulatory Region That Influences MCP-1 Expression. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 348, p. 344–348, 1999.
- SERGIPE. Abovíroses em Sergipe, 2015 - 2016. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Estado da Saúde. Diretoria de Planejamento. Núcleo Estratégico (Nest.SES)**, 2017. Disponível em: <<http://saude.se.gov.br/wp-content/uploads/Boletim-Epidemiológico-nº-4-ARBOVIROSES-EM-SERGIPE-2015-2016.pdf>>.
- SILVA, A. A.; BARBIERI, M. A.; ALVES, M. T.; et al. Prevalence and Risk Factors for Microcephaly at Birth in Brazil in 2010. **Pediatrics**, v. 141, n. 2, p. e20170589, 2016. Disponível em: <<http://pediatrics.aappublications.org/lookup/doi/10.1542/peds.2017-0589>>.
- SIRONI, M.; BIASIN, M.; CAGLIANI, R.; et al. A Common Polymorphism in TLR3 Confers Natural Resistance to HIV-1 Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 818–823, 2012. Disponível em: <<http://www.jimmunol.org/cgi/doi/10.4049/jimmunol.1102179>>.
- SMITH, D. W.; MACKENZIE, J. Zika virus and Guillain-Barré syndrome: Another viral cause to add to the list. **The Lancet**, v. 387, n. 10027, p. 1486–1488, 2016. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00564-X](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00564-X)>.
- SOUZA, T.; KEESEN, L.; ALMEIDA, R. P. De; et al. Guillain-Barré syndrome and arboviral infection in Brazil HPV control and resistance in the Middle East and north Africa. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 7, p. 693–694, 2014. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(17\)30333-X](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(17)30333-X)>.
- STETTLER, K. et al. Specificity, cross-reactivity and function of antibodies elucidated by Zika virus infection. **Science**, v. 353, n. 6296, p. 247–252, 2016. Disponível em: <www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.aaf8505/DC1>.
- STUDZIŃSKA, M.; JABŁOŃSKA, A.; WIŚNIEWSKA-LIGIER, M.; et al. Association of TLR3 L412F polymorphism with cytomegalovirus infection in children. **PLoS ONE**, v. 12, n. 1, p. 1–18, 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28046022>><<http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=PMC5207783>>.
- TANG, A. T.; CHOI, J. P.; KOTZIN, J. J.; et al. Endothelial TLR4 and the microbiome drive cerebral cavernous malformations. **Nature**, v. 545, n. 7654, p. 305–310, 2017.
- VARATHARAJ, A.; GALEA, I. The blood-brain barrier in systemic inflammation. **Brain, Behavior, and Immunity**, v. 60, p. 1–12, 2017.
- VELDHUIS, W. B.; FLORIS, S.; VAN DER MEIDE, P. H.; et al. Interferon-beta prevents cytokine-induced neutrophil infiltration and attenuates blood-brain barrier disruption. **Journal of Cerebral Blood Flow and Metabolism**, v. 23, n. 9, p. 1060–1069, 2003.
- VILLAMIL-GÓMEZ, W. E.; RODRÍGUEZ-MORALES, A. J.; URIBE-GARCÍA, A. M.; et al. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. **International Journal of Infectious Diseases**, v. 51, p. 135–138, 2016.
- WEAVER, S. C. Prediction and prevention of urban arbovirus epidemics: A challenge for the global virology community. **Antiviral Research**, v. 156, n. June, p. 80–84, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.antiviral.2018.06.009>>.

WEAVER, S. C.; REISEN, W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Research**, v. 85, n. 2, p. 328–345, 2010.

XAVIER-CARVALHO, C.; CEZAR, R. D. da S.; FREIRE, N. M.; et al. Association of rs1285933 single nucleotide polymorphism in CLEC5A gene with dengue severity and its functional effects. **Human Immunology**, 2017. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0198885917304615>>.

YUAN, L. et al.; HUANG, X. Y.; LIU, Z. Y.; et al. A single mutation in the prM protein of Zika virus contributes to fetal microcephaly. **Science**, v. 7120, n. September, p. 933–936, 2017.

ZAMBRANO, H.; WAGGONER, J. J.; ALMEIDA, C.; et al. Case report: Zika virus and chikungunya virus coinfections: A series of three cases from a single center in Ecuador. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 95, n. 4, p. 894–896, 2016.

ZHOU, P.; FAN, L.; YU, K.-D.; et al. Toll-like receptor 3 C1234T may protect against geographic atrophy through decreased dsRNA binding capacity. **The FASEB Journal**, v. 25, n. 10, p. 3489–3495, 2011. Disponível em: <<http://www.fasebj.org/doi/10.1096/fj.11-189258>>.

APÊNDICE A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Nome do Projeto: *Estudo epidemiológico, clínico e imunológico nas infecções pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue na patogênese de anomalias fetais e em doenças de indivíduos adultos.*

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DO RESPONSÁVEL

1. Nome do paciente: _____
 Documento de identidade N°: _____ Sexo : M F
 Data nascimento (dd/mm/aaaa) _____
 Endereço: _____ .N° _____
 Bairro: _____ CIDADE _____
 CEP. _____ TEL.: () _____

Instituição: _____

Data de preenchimento: (dd/mm/aaaa) _____

 Assinatura do pesquisador responsável

Investigador Principal:

Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem infecção por zika vírus ou febre chikungunya, as doenças e suas complicações, como a microcefalia. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes diagnosticados serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 500 pessoas participarão deste estudo.

Participação voluntária:

Sua participação é voluntária. Você pode se recusar a participar ou pode desistir da participação no estudo a qualquer momento. Sua recusa em participar ou desistir de participar do estudo não afetará de modo algum qualquer tratamento que você estiver recebendo.

Finalidade do estudo:

Este estudo visa determinar se a resposta imune do paciente ao parasita tem influência na afecção e identificar fatores do vírus zika ou chikungunya que possam influenciar nas doenças causadas por eles.

Procedimentos:

Caso você aceite participar do estudo, um questionário será feito para saber onde você mora, sua ocupação, seus hábitos e sua sintomatologia. Um médico o examinará para ver as características de sua doença. Você realizará os exames que já são utilizados de rotina para o diagnóstico da doença, como exame de sangue (qPCR). Além disso, seu sangue será utilizado para avaliar a resposta imune frente a antígenos do parasita. Também iremos analisar o RNA/DNA de suas células a fim de identificar possíveis marcadores genéticos que são responsáveis pelo surgimento da doença.

A participação nesta pesquisa não impede você de participar de outra pesquisa, contanto que não mude o tratamento que vai receber.

Confidencialidade:

Qualquer informação obtida durante este estudo será confidencial, sendo apenas compartilhada com outros membros da equipe médica do Comitê de Ética do Hospital Universitário. Embora os resultados obtidos neste estudo sejam publicados, não haverá na apresentação destes resultados meios que possam identificar os participantes. Suas fichas clínicas e os resultados de seus exames poderão ser também vistos pelo Comitê de Ética do Hospital Universitário. Fotos suas poderão ser mostradas em público sem identificar você e protegendo partes íntimas.

Análise de riscos e benefícios:

Todos os exames coletados são partes da rotina utilizada para o diagnóstico da zika, chikungunya ou dengue, os quais você faria mesmo se não participasse do estudo, exceto o sangue obtido ao mesmo momento que será utilizado para os estudos da resposta imune, porém não trará novos riscos para você como os previstos para retirada de sangue em rotina normal. A retirada de sangue pode causar dor no local da punção com a agulha e raramente pode ocorrer sangramento ou formação de hematoma. Porém, ocorrendo complicações, os médicos do projeto e do Hospital Universitário cuidarão de você. Após o diagnóstico da doença, você será tratado com medicações para reduzir os sintomas das doenças. Não existe tratamento específico para zika ou chikungunya. Este acompanhamento será realizado no Hospital Universitário.

Retorno de benefício para o sujeito e para a sociedade:

O melhor conhecimento sobre a resposta imune que poderá contribuir no futuro para medidas de controle da doença, assim como de fatores genéticos de coagulação que interferem na clínica da doença.

Custos:

Você não terá custos com a participação no estudo e, caso necessite de tratamento, a medicação lhe será fornecida gratuitamente. Você não receberá nenhum pagamento para participar desta pesquisa. Poderemos apenas contribuir com o seu transporte para comparecer as visitas no ambulatório após a alta do hospital.

Esclarecimentos:

Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)98823-7244). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário, cujo endereço consta no início deste consentimento.

Consentimento:

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Uma cópia deste consentimento lhe será entregue. Favor assinalar um dos quadros abaixo para indicar se deseja ou não ter o parasito que causa esta doença armazenado para estudos futuros aprovados sobre arboviroses.

ACEITO que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre arboviroses.

NÃOACEITO que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre arboviroses.

_____	_____	_____
Assinatura ou impressão do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Nome/Assinatura da testemunha	Data	Hora



TERMO DE CONSENTIMENTO PARA MENORES DE IDADE (MENORES DE 18)

Nome do Projeto: *Estudo epidemiológico, clínico e imunológico nas infecções pelos vírus Zika, Chikungunya e Dengue na patogênese de anomalias fetais e em doenças de indivíduos adultos.*

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO VOLUNTÁRIO E DO RESPONSÁVEL

1. Nome do paciente: _____
 Documento de identidade N°: _____ Sexo : M F
 Data nascimento (dd/mm/aaaa) _____
 Endereço: _____ .N° _____
 Bairro: _____ Cidade _____
 CEP. _____ TEL.: () _____

2. Responsável legal _____
 Grau de Parentesco _____
 Documento de Identidade: _____ Sexo: M F
 Data nascimento: (dd/mm/aaaa) _____
 Endereço: _____ .N° _____
 Bairro: _____ Cidade _____
 CEP _____ TEL: () _____

Instituição: _____

Pesquisador(a) Responsável: _____

Data de preenchimento: (dd/mm/aaaa) _____

 Assinatura do pesquisador responsável

Investigador Principal:

Roque Pacheco de Almeida, Hospital Universitário da UFS, Aracaju-Sergipe-Brasil.

Convite e Objetivo:

Você está sendo convidado a participar de um estudo cujo objetivo é identificar pessoas que tem infecção por zika vírus ou febre chikungunya as doenças e suas complicações, como a microcefalia. Após lhe ser explicado o que contém neste documento, você pode perguntar

tudo sobre a pesquisa a seu médico. Todos os pacientes diagnosticados serão convidados a participar do estudo. Caso decida participar do estudo, você será solicitado a assinar este consentimento. Aproximadamente 500 pessoas participarão deste estudo.

Nós perguntaremos a seus pais sobre sua saúde. Um médico lhe fará exames que não causarão dor. Então, nós tiraremos um pouco de sangue (cerca de 2 colheres de sopa) de seu braço, usando uma seringa e agulha. Você pode ou não participar deste estudo. Se você quiser participar, por favor, assine ou coloque sua impressão digital abaixo.

Esclarecimentos:

Caso tenha alguma pergunta ou apresente alguma complicação relacionada aos procedimentos realizados na pesquisa, você pode ligar para Dr. Roque Pacheco de Almeida (Tel.: (79)98823-7244). Caso você queira saber alguma coisa sobre os seus direitos ou de seu filho.

ACEITO que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre arbovirose.

NÃO ACEITO que o parasito que causa esta doença seja armazenado para estudos futuros aprovados sobre arbovirose.

_____ Data _____ Hora _____
Assinatura ou impressão do paciente se entre 12 e 17 anos

_____ Data _____ Hora _____
Assinatura ou impressão do responsável

_____ Data _____ Hora _____
Testemunha

_____ Data _____ Hora _____
Investigador

APÊNDICE B - QUESTIONÁRIO



QUESTIONÁRIO ARBOVIROSES- GESTANTE

Nome da paciente: _____ Data: _____
 ____/____/____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____

Endereço: _____

Município: _____

Idade gestacional: _____

Telefone: _____

Cartão do SUS: _____

Sintomatologia:

Sintomas	Presente	Ausente	Duração dos sintomas (dias)
Febre			
Artralgia			
Eczantema			
Conjuntivite			
Mialgia			
Dor retro-orbitária			
Linfadenopatia			

Usa ou usou algum medicamento?

Sim () Não ()

Foram específicos para os sintomas da doença?

Sim () Não ()

Quais medicamentos:

Anticoncepcional () Anti-histaminico () Anti-inflamatório ()

Analgésico () Antitérmico () Anti-hipertensivo ()

Anti-diabéticos orais () Outros ()

Se outros, especifique: _____

Tomou alguma vacina recentemente

Sim () Não ()

Se sim, especifique: _____

Tem algum tipo de alergia?

() Rinite () Asma () Dermatite () Urticária () Não

Outros () Se outros, especificar: _____

Tem alergia a medicamentos?

Sim () Não ()

Se sim, especificar: _____

Fumou ou fuma durante a gestação?

Sim () Não ()

Se sim, especifique a quantidade: _____

Ingeria ou ingere bebida alcoólica?

Sim () Não ()

Há casos confirmados de microcefalia na família?

Sim () Não ()

Se sim, especifique o parentesco: _____

Está realizando ou realizou o pré-natal?

Sim () Não ()

Fez a suplementação de Ácido Fólico durante o pré-natal?

Sim () Não ()

Teve diagnóstico, durante o pré-natal, de alguma das doenças abaixo?

Citomegalovírus () Rubéola () Herpes viral ()

Sífilis () Toxoplasmose ()

Há ou houve alguma complicação durante a gravidez?

Sim () Não ()

Se sim, especifique: _____

Teve gestações passadas?

Sim () Não ()

Se sim, ocorreram complicações nas gestações passadas?

Sim () Não ()



QUESTIONÁRIO ARBOVIROSES

Nome do paciente: _____ Data: _____
 ____/____/____

Data de nascimento: ____/____/____ Idade: _____ Sexo: _____

Endereço: _____

Município: _____

Telefone: _____

Cartão do SUS: _____

Sintomatologia:

Sintomas	Presente	Ausente	Duração dos sintomas (dias)
Febre			
Artralgia			
Eczantema			
Conjuntivite			
Mialgia			
Dor retro-orbitária			
Linfadenopatia			

Usa ou usou algum medicamento?

Sim () Não ()

Foram específicos para os sintomas da doença?

Sim () Não ()

Quais medicamentos:

Anticoncepcional () Anti-histaminico () Anti-inflamatório ()

Analgésico () Antitérmico () Anti-hipertensivo ()

Anti-diabéticos orais () Outros ()

Se outros, especificar: _____

Tem algum tipo de alergia?

() Rinite () Asma () Dermatite () Urticária () Não

Outros () Se outros, especificar: _____

Tem alergia a medicamentos?

Sim () Não ()

Se sim, especificar: _____

