



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

**CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE DA  
SÍNDROME CONGÊNITA DO VÍRUS *Zika* E À RECORRÊNCIA DA COVID-19**

**ARACAJU  
2023**

**CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE DA  
SÍNDROME CONGÊNITA DO VÍRUS *Zika* E À RECORRÊNCIA DA COVID-19**

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

Orientadora: Prof.<sup>a</sup> Dra. Priscila Lima dos Santos  
Coorientador: Prof. Dr. Lucas Sousa Magalhães

**ARACAJU  
2023**

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA DA SAÚDE – BISAU  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SERGIPE**

S237a Santos, Camilla Natália Oliveira  
Aspectos imunológicos associados à ocorrência e gravidade da  
síndrome congênita do vírus Zika e à recorrência da COVID-19 /  
Camilla Natália Oliveira Santos ; orientadora Priscila Lima dos  
Santos. – Aracaju, 2023.  
122 f. : il.

Tese (doutorado em Ciências da Saúde) – Universidade  
Federal de Sergipe, 2023.

1. Infecção viral. 2. Microcefalia. 3. Zika vírus. 4. COVID-19  
(doença). 5. Recorrência. I. Santos, Priscila Lima dos, orient. II.  
Título.

CDU 61:578.834

**CAMILLA NATÁLIA OLIVEIRA SANTOS**

**ASPECTOS IMUNOLÓGICOS ASSOCIADOS À OCORRÊNCIA E GRAVIDADE DA  
SÍNDROME CONGÊNITA DO VÍRUS *Zika* E À RECORRÊNCIA DA COVID-19**

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

Aprovada em: 10/01/2023

Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dra. Priscila Lima dos Santos  
Universidade Federal de Sergipe

---

1° Examinador: Prof<sup>a</sup>. Prof<sup>a</sup>. Dra. Tatiana Rodrigues de Moura  
Universidade Federal de Sergipe

---

2° Examinador: Prof. Dr. Marcus Vinícius de Aragão Batista  
Universidade Federal de Sergipe

---

3° Examinador: Prof. Dr. Abelardo Silva Junior  
Universidade Federal de Alagoas

---

4° Examinador: Prof<sup>a</sup>. Dra. Ângela Maria da Silva  
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, FINEP, CNPq e FAPITEC, que tornaram possível a realização deste estudo;

Aos meus orientadores e a todos os professores do Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde e do Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da UFS, em especial a Dra. Amélia Maria Ribeiro de Jesus e Dr. Roque Pacheco de Almeida, pela ajuda e ensinamentos disponibilizados a mim durante toda a minha trajetória na pós-graduação, os quais contribuíram imensuravelmente para minha formação e realização deste trabalho;

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia e Biologia molecular, pelo convívio diário, companhia e disponibilidade em compartilhar seus aprendizados;

À equipe do ambulatório de microcefalia, em especial às pediatras Adriana Fonseca, Ana Jovina Bispo e Roseane Porto;

A todos os pacientes voluntários que aceitaram participar deste estudo. Este trabalho não existiria sem a participação de vocês.

Aos pesquisadores e estudantes do Laboratório de Imunofarmacologia, UFMG.

Muito obrigada!

## RESUMO

As infecções pelo vírus *Zika* geralmente são assintomáticas ou causam doença leve e autolimitada, contudo, podem ocorrer desfechos graves, como a síndrome congênita do *Zika* (SCZ) em neonatos. A maioria das infecções pelo SARS-CoV-2 também causam doença leve, porém sua rápida e ampla distribuição tem levado a casos de recorrência da doença. Estes desfechos atípicos ocorrem em uma pequena parcela de infectados e os fatores determinantes para a ocorrência dos mesmos são pouco compreendidos. Variações na resposta imune do hospedeiro influenciam a susceptibilidade ou resistência às doenças. Considerando isso, os objetivos desta tese foram avaliar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes candidatos com infecção pelo vírus *Zika* e a ocorrência da síndrome congênita do *Zika* (Capítulo I) e caracterizar a resposta imune celular de pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 (Capítulo II). Para isto, foi realizado um estudo de caso-controle, no qual o grupo caso foi composto por crianças com SCZ e suas mães, e o grupo controle, composto por crianças saudáveis que nasceram no mesmo local e período do surto de vírus *Zika* e suas mães. DNA genômico de pacientes e controles foram obtidos e utilizados na genotipagem dos SNPs nos genes TREM1, CXCL10, IL4, CXCL8, TLR3, TLR7, IFNR1, IFN $\gamma$ , CXCR1, IL10, CCR2 e CCR5, e a associação com a infecção pelo vírus *Zika* e a SCZ foi verificada. Os resultados mostraram associação entre os SNPs TREM1 rs2234246 e IL4 rs224325 nas mães e a ocorrência de SCZ, quando comparadas às mães do grupo controle. Ademais, os SNPs CXCL10 rs4508917 e CXCL8 rs4073 foram associados à presença de SCZ, e os SNPs CXCL8 rs4073 e TLR7 rs179008 foram associados com a gravidade da microcefalia decorrente da SCZ. Para o estudo descrito no Capítulo II foi feito um estudo de série de casos com grupo controle, comparando a resposta imune específica de grupos de pacientes com recorrência, um único episódio ou sem histórico de COVID-19, no qual as células mononucleares do sangue periférico foram estimuladas com a proteína S1 do SARS-CoV-2 e foi avaliado o fenótipo das células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> multifuncionais, pela produção de IFN- $\gamma$  e/ou IL-2 e/ou TNF- $\alpha$ , por citometria de fluxo. A avaliação dos linfócitos mostrou que a proteína S1 do SARS-CoV-2 pode estimular a produção de citocinas em linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> nos grupos de pacientes analisados, sem diferenças significativas no percentual total de células, entre os grupos de pacientes com COVID-19 recorrente ou com um único episódio, seja antes ou depois da vacinação. Entretanto, pacientes que tiveram COVID-19 e positivaram para IgG anti-S1 produziram mais células CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> do que aqueles que tiveram doença e eram negativos para IgG. Ademais, a vacinação promoveu aumento significativo na produção de anticorpos do tipo IgG para a proteína S1 do SARS-CoV-2 em todos os grupos e promoveu uma mudança no padrão fenotípico das células T para as citocinas avaliadas. Em conclusão, os resultados sugerem que a genética materna é um fator importante para a ocorrência da SCZ e, do mesmo modo, que a genética do conceito pode contribuir tanto para a ocorrência quanto para a gravidade da SCZ. Ademais, os dados sugerem que células T multifuncionais produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  duplas ou triplas positivas para estas citocinas, não são um fator relevante para a ocorrência de quadros de recorrência da COVID-19. Juntos, os dados contribuem para uma melhor compreensão da resposta imune do hospedeiro e sua relação com os diferentes desfechos frente às infecções pelo ZIKV e SARSCoV-2.

**Descritores:** Infecção viral. Microcefalia. Vírus *Zika*. Polimorfismos genéticos. SARS-CoV-2. Recorrência.

## ABSTRACT

*Zika* virus infections are usually asymptomatic or cause mild, self-limited illness, however, severe infections such as congenital *Zika* syndrome (CZS) in neonates can occur. Most SARS-CoV-2 infections also cause mild illness, but its rapid and widespread distribution has led to cases of disease recurrence. These atypical outcomes occur in a small number of infected people and the determining factors for their occurrence are poorly understood. Variations in the immune response influence susceptibility or resistance to disease. Considering this, the aims of this thesis were to evaluate the association between single nucleotide polymorphisms (SNPs) in candidate genes with *Zika* virus infection and the occurrence of congenital *Zika* syndrome (Chapter I). For this, a case-control study was conducted, in which the case group was composed of children with SCZ and their mothers, and the control group, composed of healthy children who were born in the same place and period of the *Zika* virus outbreak and their mothers. Genomic DNA from patients and controls was obtained and used in the genotyping of the SNPs in the TREM1, CXCL10, IL4, CXCL8, TLR3, TLR7, IFN $\gamma$ , CXCR1, IL10, CCR2 and CCR5 genes, and the association with *Zika* virus infection and the SCZ has been verified. The results showed an association between the SNPs TREM1 rs2234246 and IL4 rs224325 in mothers and the occurrence of SCZ, when compared to mothers in the control group. Furthermore, the SNPs CXCL10 rs4508917 and CXCL8 rs4073 were associated with the presence of SCZ, and the SNPs CXCL8 rs4073 and TRL7 rs179008 were associated with the severity of microcephaly due to SCZ. For the study described in Chapter II, a case series study with a control group was carried out, comparing the specific immune response of groups of patients with recurrence, a single episode or no history of COVID-19, in which peripheral blood mononuclear cells were stimulated with the S1 protein of SARS-CoV-2 and the phenotype of CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> multifunctional T cells was evaluated, by the production of IFN- $\gamma$  and/or IL-2 and/or TNF- $\alpha$ , by flow cytometry. Lymphocyte evaluation showed that SARS-CoV-2 S1 protein can stimulate cytokine production in CD4<sup>+</sup> and CD8<sup>+</sup> T lymphocytes in the analyzed patient groups, with no significant differences in the total percentage of cells, between groups of patients with recurrent COVID-19 or with a single episode, either before or after vaccination. However, patients who had COVID-19 and tested positive for anti-S1 IgG produced more CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> cells than those who had the disease and were negative for IgG anti-S1. In addition, vaccination promoted a significant increase in the production of IgG-type antibodies to the SARS-CoV-2 S1 protein in all groups and promoted a change in the phenotypic pattern of T lymphocytes for the evaluated cytokines. In conclusion, the results suggest that maternal genetics is an important factor for the occurrence of SCZ and, likewise, that conceptus genetics may contribute to both the occurrence and severity of SCZ. Furthermore, the data suggest that multifunctional T cells producing IFN- $\gamma$ , IL-2 and TNF- $\alpha$ , double or triple positive for these cytokines, are not a relevant factor for the occurrence of COVID-19 recurrences. Together, the data contribute to a better understanding of the host's immune response and its relationship with different outcomes in the *Zika* virus and SARSCoV-2 infections.

**Descriptors:** Virus infection. Microcephaly. *Zika* virus. Genetic polymorphisms. SARS-CoV-2. Recurrence.

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> Informações clínico-epidemiológicas dos indivíduos incluídos no estudo de associação entre a síndrome congênita do <i>Zika</i> e polimorfismos de nucleotídeo único.....	30
<b>Tabela 2</b> Variáveis clínico-epidemiológicas nos casos de síndrome congênita do <i>Zika</i> estratificados pela gravidade da microcefalia.....	31
<b>Tabela 3</b> Teste de EHW na população controle para os polimorfismos de nucleotídeo único estudados.....	33
<b>Tabela 4.</b> Frequências alélicas e genótípicas totais de todos os polimorfismos de nucleotídeo único analisados .....	34
<b>Tabela 5</b> Frequência e distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo de nucleotídeo único TREM1 rs2234246 e sua associação com a síndrome congênita do <i>Zika</i> .....	38
<b>Tabela 6</b> Frequência e distribuição de alelos e genótipos dos polimorfismos de nucleotídeo único CXCL10 rs4508917, IL4 rs2243250 e CXCL8 rs4073 SNP e suas associações com a síndrome congênita do <i>Zika</i> .....	40
<b>Tabela 7</b> Associação entre as frequências alélicas do CXCL8 rs4073 e TRL7 rs179008 com a gravidade da microcefalia na síndrome congênita do <i>Zika</i> .....	42
<b>Tabela 8</b> Informações clínico-epidemiológicas dos indivíduos dos pacientes com recorrência de COVID-19 e grupos controle.....	68
<b>Tabela 9</b> Presença de anticorpos contra SARS-CoV-2 antes e após vacinação.....	69

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1</b> Perfil de detecção de IgG anti-S1 em pacientes com história da COVID-19 e controles.....	70
<b>Figura 2</b> Painel ilustrativo representando os parâmetros usados na citometria de fluxo para obtenção dos perfis funcionais de células TCD4 <sup>+</sup> e TCD8 <sup>+</sup> produzindo IFN $\gamma$ , IL-2 e TNF $\alpha$ .....	71
<b>Figura 3</b> Avaliação do fenótipo de linfócitos T multifuncionais em pacientes com ou sem histórico de COVID-19 antes da vacinação.....	72
<b>Figura 4</b> Avaliação do fenótipo de linfócitos T multifuncionais em pacientes com ou sem histórico de COVID-19 de acordo com a produção de IgG anti-S1 antes da vacinação.....	73
<b>Figura 5</b> Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células estimuladas com S1 antes da vacinação.....	74
<b>Figura 6</b> Análise da influência de vacinação no perfil fenotípico de linfócitos T multifuncionais.....	76

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	4
<b>CAPÍTULO I - Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único com a ocorrência e gravidade da síndrome congênita do Zika</b> .....	7
<b>2 VÍRUS Zika</b> .....	8
<b>2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos das infecções pelo vírus Zika</b> .....	9
2.1.1 Síndrome congênita do Zika .....	11
<b>2.2 Aspectos imunológicos associados às infecções pelo vírus Zika</b> .....	13
<b>3 SNPs E SUSCEPTIBILIDADE ÀS INFECÇÕES VIRAIS</b> .....	17
<b>3.1 Papel dos SNPs na resposta imune ao vírus Zika</b> .....	17
<b>4 OBJETIVOS</b> .....	20
<b>4.1. Geral</b> .....	20
<b>4.2. Específicos</b> .....	20
<b>5 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	21
<b>5.1 Delineamento do estudo e desenho experimental</b> .....	21
5.1.1 Desenho experimental dos objetivos específicos .....	21
<b>5.2 Aspectos éticos</b> .....	22
<b>5.3 Local de realização do estudo</b> .....	22
<b>5.4 População estudada</b> .....	22
5.4.1 Critérios de inclusão e exclusão .....	23
<b>5.5 Metodologias dos objetivos específicos</b> .....	24
5.5.1 Coleta de informações clínico-epidemiológicas .....	24
5.5.2 Obtenção de soro e plasma .....	24
5.5.3 Obtenção de DNA genômico .....	24
5.5.4 Quantificação do gDNA .....	25
5.5.5 Genotipagem dos SNPs por qPCR .....	25
5.5.6 Diagnóstico da infecção pelo vírus Zika .....	26
5.5.6.1 Diagnóstico por sorologia - ELISA .....	27

5.5.7 Análise estatística.....	27
<b>6 RESULTADOS .....</b>	<b>29</b>
<b>6.1 Características clínico-epidemiológicas .....</b>	<b>29</b>
<b>6.2 Distribuição e comparação das frequências alélicas e genotípicas para os SNPs analisados.....</b>	<b>32</b>
6.2.1 Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único TREM1 rs2234246, CXCL10 rs4508917, IL4 rs224325 e CXCL8 rs4073 com a síndrome congênita do <i>Zika</i> .....	38
6.2.2 Associação entre as frequências alélicas do CXCL8 rs4073 e TRL7 rs179008 com a gravidade da microcefalia na síndrome congênita do <i>Zika</i> .....	41
<b>7 DISCUSSÃO .....</b>	<b>43</b>
<b>7.1 Associação entre TREM1 rs2234246, CXCL10 rs4508917, IL4 rs224325 e CXCL8 rs4073 e a ocorrência da síndrome congênita do <i>Zika</i>.....</b>	<b>43</b>
<b>7.2 Associação entre as frequências alélicas do CXCL8 rs4073 e TRL7 rs179008 com a gravidade da microcefalia na síndrome congênita do <i>Zika</i>.....</b>	<b>48</b>
<b>8 CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>CAPÍTULO II - Avaliação in vitro do fenótipo da resposta imune dos linfócitos T de pacientes com recorrência da COVID-19 .....</b>	<b>52</b>
<b>9 SARS-CoV-2 .....</b>	<b>53</b>
<b>9.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos das infecções por SARS-CoV-2 .....</b>	<b>53</b>
9.1.1 Recorrência da COVID-19 .....	56
<b>9.2 Aspectos imunológicos associados às infecções por SARS-CoV-2.....</b>	<b>56</b>
<b>10 OBJETIVOS .....</b>	<b>60</b>
<b>10.1 Geral.....</b>	<b>60</b>
<b>10.2 Específicos.....</b>	<b>60</b>
<b>11 MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>61</b>
<b>11.1 Delineamento do estudo e desenho experimental.....</b>	<b>61</b>
<b>11.2 Aspectos éticos.....</b>	<b>61</b>
<b>11.3 População estudada .....</b>	<b>62</b>

11.3.1 Critérios de inclusão e exclusão .....	63
<b>11.4 Coleta de informações clínico-epidemiológicas .....</b>	<b>63</b>
<b>11.5 Coleta de material biológico.....</b>	<b>63</b>
11.5.1 Obtenção de soro e plasma.....	63
11.5.2 Obtenção e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC) .....	64
<b>11.6 Ensaio relacionados aos Objetivos Específicos .....</b>	<b>64</b>
11.6.1 Caracterização da resposta de linfócitos por citometria de fluxo.....	64
11.6.2 Dosagens de IgG e IgA específicos para SARS-CoV-2 .....	65
11.6.3 Dosagem de citocinas.....	65
11.6.4 Análise estatística.....	66
<b>12 RESULTADOS .....</b>	<b>67</b>
<b>12.1 Características clínico-epidemiológicas .....</b>	<b>67</b>
<b>12.2 Detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 e controles, antes e após a vacinação. ....</b>	<b>69</b>
<b>12.3 Avaliação de células T multifuncionais em pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 e grupos controles antes e após a vacinação .....</b>	<b>70</b>
<b>13 DISCUSSÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>14 CONCLUSÕES.....</b>	<b>82</b>
<b>15 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>83</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>84</b>
<b>APÊNDICE A .....</b>	<b>101</b>
<b>APÊNDICE B.....</b>	<b>106</b>
<b>APÊNDICE C .....</b>	<b>109</b>
<b>APÊNDICE D – .....</b>	<b>111</b>

## 1 INTRODUÇÃO

Apesar da simplicidade organizacional, os vírus, microrganismos acelulares de constituição simples e parasitos intracelulares obrigatórios, ocupam um lugar de destaque na saúde pública mundial. Historicamente, as viroses, doenças infecciosas causadas por vírus, vêm causando pandemias ou epidemias emergentes e reemergentes em todo o mundo. Exemplos importantes desse tipo de doença infecciosa na atualidade são as arboviroses e as síndromes respiratórias virais, responsáveis por milhares de casos e óbitos globais anualmente (CAVALCANTI; FREITAS; BRASIL; et al., 2017; TROEGER; FOROUZANFAR; RAO; et al., 2017; HUANG; WANG; LI; et al., 2020; WHO, 2022a).

As arboviroses 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; GUTIÉRREZ-BUGALLO; PIEDRA; RODRIGUEZ; et al., 2019). No Brasil, a alta incidência de arboviroses causadas pelos vírus do gênero *Alphavirus*, especialmente pelo vírus *Chikungunya*, causador da febre Chikungunya, e do gênero *Flavivirus*, pelos quatro sorotipos do vírus *Dengue DENV-1*, *DENV-2*, *DENV-3* e *DENV-4*, causadores da Dengue, e vírus *Zika*, causador das doenças agudas pelo vírus *Zika*, também chamada simplesmente de zika, são um grave problema de saúde pública. Dentre estas arboviroses, as infecções pelo vírus *Zika*, transmitidas em áreas urbanas e periurbanas pelos mosquitos do gênero *Aedes*, ganharam notoriedade desde abril de 2015 devido a sua associação em larga escala com diversas complicações de ordem neurológica e malformações congênitas (BRASIL, 2018a, 2018b).

Com transmissão independente de vetor, os vírus causadores das síndromes respiratórias em humanos geralmente possuem maior facilidade de disseminação, como os vírus dos gêneros *Influenzavirus A* e *B*, e os vírus da família *Coronaviridae*, comumente conhecidos como coronavírus (CoVs). Até o momento, os principais coronavírus que conseguem infectar humanos são o coronavírus da síndrome respiratória aguda grave (SARS-CoV), causador da epidemia de 2002 a 2003, o coronavírus da síndrome respiratória do Oriente Médio (MERS-CoV) e o novo coronavírus da síndrome respiratória aguda grave 2 (SARS-CoV-2), causador da doença do coronavírus 2019 (COVID-19) (GORBALENYA; BAKER; BARIC; et al., 2020), e responsável pela pandemia iniciada em 2019, que atingiu proporções nunca vistas na história, com grande impacto global na saúde, estilo de vida, comportamento social e atividades econômicas (CHEN; VULLIKANTI; SANTOS; et al.,

2021; KAYE; OKEAGU; PHAM; et al., 2021; REGI; REGI, 2021; VARONA; GONZALES, 2021).

Desde 2020 a circulação e transmissão dos arbovírus ocorrem simultaneamente às de SARS-CoV-2, em países endêmicos nas Américas, especialmente no Brasil, o que exacerba os desafios dos sistemas de saúde acerca de, mas não somente, subnotificações de casos de ambas as viroses e vigilância epidemiológica (REGI; REGI, 2021).

Apesar de diversos esforços da comunidade científica, a resposta imunológica (RI) desenvolvida durante as infecções pelos vírus *Zika* e SARS-CoV-2 não está completamente elucidada e existem dificuldades na compreensão das nuances que contribuem para o agravamento dos casos e evolução variável dos pacientes (PIERSON; DIAMOND, 2018; LI; WANG; SUN; et al., 2022).

Por serem doenças multifatoriais, na qual os determinantes ambientais, características do patógeno e do hospedeiro exercem influência tanto na ocorrência da doença como em sua apresentação clínica, espera-se também que as infecções por vírus *Zika* e por SARS-CoV-2 sejam influenciadas por um conjunto de fatores orquestrados pela genética e fenótipos celulares do hospedeiro.

A existência de polimorfismos genéticos é um dos fatores que ajuda a explicar a susceptibilidade ou resistência às doenças multifatoriais, incluindo as doenças infecciosas, no hospedeiro humano. Dentre estes, os Polimorfismos de Nucleotídeo Único (SNPs), que são sítios no genoma onde variantes de um nucleotídeo são comuns na população (>1%) (ALBERTS; JOHNSON; LEWINS et al., 2017), são importantes na identificação de genes que podem estar relacionados à predisposição ou gravidade das doenças. Estudos nos últimos anos sobre estes determinantes genéticos na RI têm esclarecido a imunopatogênese de diversas doenças infecciosas, incluindo as virais (CASANOVA; ABEL, 2002; KHOR; CHAU; PANG; et al., 2011; FANG; HU; SHANG; et al., 2012; MCLAREN; CARRINGTON, 2015; ELLINGHAUS; DEGENHARDT; BUJANDA; et al., 2020).

Ademais, variações no fenótipo das células da RI, especialmente relacionadas às funções efectoras e proliferativas dos linfócitos T CD4 e T CD8 podem estar relacionadas aos diferentes desfechos das infecções virais, uma vez que, em geral, a não ativação ou a redução no número de linfócitos impacta negativamente no controle da carga viral, propiciando aumento de viremia e doença. Logo, a avaliação dos perfis dos linfócitos T CD4 e T CD8, importantes para a RI contra vírus, em pacientes com diferentes quadros de doença, é um caminho imprescindível para identificar mecanismos que podem estar contribuindo para a ocorrência de variações fenotípicas na doença, como casos mais graves e casos recorrentes de

infecções (SEDER; DARRAH; ROEDERER, 2008; WESTERHOF; MCGUIRE; MACLELLAN; et al., 2019).

Desse modo, compreendendo a importância dos mecanismos imunogenéticos no curso e na determinação das fisiopatologias das doenças causadas pelo vírus *Zika* e SARS-CoV-2, no presente estudo, foi investigada a associação de SNPs funcionais em genes da RI com a ocorrência e gravidade do desfecho das infecções causadas pelo vírus *Zika*. Ademais, foram avaliadas diferenças na dinâmica dos linfócitos T e a influência destas na determinação dos fenótipos associados à quadros de recorrência da COVID-19.

**CAPÍTULO I - Associação entre polimorfismos de nucleotídeo único com a ocorrência e gravidade da síndrome congênita do Zika**

## 2 VÍRUS *Zika*

O vírus *Zika* foi isolado pela primeira vez em 1947, a partir de um primata do gênero *Rhesus*, proveniente da floresta Zika, na Uganda, leste da África, 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 vírus *Zika* possui um envelope lipídico icosaédrico de aproximadamente 500 Å e seu material genético é composto por uma fita simples de ácido ribonucleico (RNA) de sentido positivo e tamanho variável entre 10 – 11 quilobases, dividida em uma região aberta de leitura (*Open Reading Frame, ORF*) e duas regiões não codificantes (*Untranslated regions, UTR*) (LIU; DONG; CHEN; et al., 2010). Este genoma é envolvido por um capsídeo viral e codifica uma única poliproteína que é clivada em 3 glicoproteínas estruturais (C, capsídeo; prM/M, pré-membrana; E, envelope) e 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), que são principalmente envolvidas na replicação, montagem e maturação das partículas virais, assim como na evasão do vírus à RI do hospedeiro humano (HASAN; SEVVANA; KUHN; et al., 2018).

Análises filogenéticas descrevem duas linhagens diferentes de vírus *Zika*, a linhagem africana e a linhagem asiática, que possuem cerca de 12% de diferenças entre seus genomas (HADDOW; SCHUH; YASUDA; et al., 2012). Contudo, estudos têm sugerido uma terceira linhagem, a linhagem americana, apontada como a causadora da epidemia no Brasil e derivada da linhagem asiática do vírus (LANCIOTTI; LAMBERT; HOLODNIY; et al., 2016; GUBLER; VASILAKIS; MUSSO, 2017).

Yuan e colaboradores mostraram evidências de que diferenças no genoma destas linhagens, relacionadas à substituição de aminoácidos na proteína estrutural prM, conferiu à cepa asiática do vírus *Zika* maior virulência e um maior potencial neuroinvasivo quando comparado 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 vírus *Zika* (YUAN; HUANG; LIU; et al., 2017). O potencial neuroinvasivo adquirido pelo 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 advindas da infecção pelo vírus *Zika* (GOODFELLOW; WILLARD; WU; et al., 2018).

## **2.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos das infecções pelo vírus *Zika***

A transmissão do vírus *Zika* ocorre essencialmente de forma horizontal, através da picada de mosquitos infectados 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 de forma vertical. Estas formas secundárias mostraram-se bastante relevantes epidemiologicamente para a transmissão e curso de desfechos graves advindos da infecção pelo vírus *Zika* (ARAGÃO, M.F.V.; LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, 2016).

Desde o seu primeiro isolamento, em 1947, as infecções por vírus *Zika* foram documentadas de forma esporádica e sem ocorrência de complicações clínicas, até o ano de 2007, quando casos de infecções pelo vírus *Zika* foram reportados fora dos continentes asiático e africano, com destaque para a epidemia de *Zika* 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 entre 2016 e 2017, mais de 40 países no sul do Pacífico e nas Américas relataram transmissão autóctone deste vírus. Desde então, milhares de casos de infecções pelo vírus *Zika* foram reportados ao redor do mundo, incluindo notificações de casos com complicações neurológicas graves em adultos e mal formações congênitas, que configuram a Síndrome Congênita do *Zika* (SCZ) caracterizada por uma série de malformações congênitas de ordem neurológica e estrutural, que podem acometer o feto quando a mãe é infectada por *Zika* durante a gestação. (DUFFY; CHEN; HANCOCK; et al., 2009; CAO-LORMEAU, VAN MAI; ROCHE, CLAUDINE; TEISSIER, 2014; IOOS; MALLET; LEPARC GOFFART; et al., 2014; CAO-LORMEAU; BLAKE; MONS; et al., 2016; WHO, 2018).

No Brasil, entre os anos de 2015-2017 foram notificados mais de 233 mil casos prováveis da doença aguda pelo vírus *Zika* (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 pelo vírus *Zika*, com associações confirmadas posteriormente em diversos estudos (ARAGÃO, M.F.V.; LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, 2016; CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; et al., 2016; PETERSEN; WILSON; TOUCH; et al., 2016).

Apesar de uma diminuição acentuada no número de casos de infecções pelo vírus *Zika* no Brasil a partir de 2017, nos anos de 2018 e 2019 foram confirmados nove óbitos e 18.676 casos prováveis (BRASIL, 2018a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020). Em 2021, até a semana epidemiológica 45 (novembro de 2021), ocorreram 6.020 casos prováveis de infecções por *Zika*, enquanto que em 2022, até a semana epidemiológica 17 (abril de 2022), 3.140 casos prováveis foram notificados (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021; BRASIL, 2022). Em relação a 2021, os dados representam um aumento de 70,7% no número notificado de casos de zika no país, o que demonstra que a dinâmica epidemiológica desta arbovirose ainda não está clara e o risco de uma nova epidemia é eminente e alertado pela comunidade científica (WEAVER, 2018; LIU; SHI; QIN, 2019; MUSSO; KO; BAUD, 2019; BRASIL, 2022).

As infecções por vírus *Zika* são em sua maioria assintomáticas (cerca de 60 a 80%). Para as infecções sintomáticas, é relatada sintomatologia leve, autolimitada e inespecífica que incluem erupção cutânea, febre moderada, artralgia, conjuntivite, mialgia, dor retro-orbital e cefaleia, com duração aproximada de 3 a 7 dias (PETERSEN, 2016; RIBEIRO; MARQUES; JESUS; et al., 2016; PIERSON; DIAMOND, 2018). Em função da inespecificidade de sintomas, a infecção pelo vírus *Zika* pode ser confundida com outras doenças exantemáticas febris, principalmente as causadas pelos vírus *Dengue* e *Chikungunya* (PETERSEN, 2016). Esse aspecto, somado à indisponibilidade de testes diagnósticos específicos nas unidades hospitalares, pode ter contribuído para uma 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 *Dengue* e *Chikungunya* com a infecção por vírus *Zika*, 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 *Zika*, 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 compreendido.

Contudo, a associação do vírus *Zika* com meningoencefalites, Síndrome de Guillain-Barré e outras complicações neurológicas em adultos (SOUZA; KEESSEN; 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 ocorrência da SCZ, são a maior preocupação quanto ao acometimento desta infecção (CUGOLA; FERNANDES; RUSSO; et al., 2016; DUARTE DOS SANTOS; GOLDENBERG, 2016; LUCCHESI; KANDUC; G., 2016; PLATT; SMITH; ARORA; et al., 2018; MUSSO; KO; BAUD, 2019).

Segundo dados do Ministério da Saúde e Secretaria de Vigilância em Saúde do Brasil, entre 2015 e 2020, foram notificados ao Ministério da Saúde 19.492 casos suspeitos de SCZ e outras etiologias infecciosas, dos quais 3.563 (18,3%) foram confirmados. Embora o período de emergência para as infecções por *Zika* tenha sido encerrado no Brasil, 886 novos casos de SCZ foram notificados somente em 2020, até a semana epidemiológica 45 (novembro de 2020) (BRASIL, 2020), o que demonstra que novos casos de SCZ continuam ocorrendo no país.

Ainda não existem vacinas aprovadas contra as infecções por vírus *Zika*, contudo, vacinas candidatas têm sido desenvolvidas e demonstrado resultados promissores (ABBINK; STEPHENSON; BAROUCH, 2018; TEBAS; ROBERTS; MUTHUMANI; et al., 2021). Esta conjectura epidemiológica atual aponta para a necessidade de vigilância e esforços coletivos na compreensão dos aspectos imunológicos da doença, a fim de mitigar a ocorrência de novos casos de SCZ.

### 2.1.1 Síndrome congênita do *Zika*

A ação teratogênica das infecções por vírus *Zika* culmina em morte fetal ou na ocorrência da SCZ, uma condição com efeitos devastadores para a criança e a família. Exames de neuroimagem de crianças nascidas com SCZ revelaram a presença de calcificações e malformações cerebrais, hipoplasia, ventriculomegalia, defeitos de mielinização, entre outras anormalidades. Estas malformações no SNC acabam por propiciar a apresentação clínica variável da SCZ, possuindo como principal característica a presença de microcefalia em diferentes níveis, no entanto, anormalidades oculares, danos neurossensoriais, perda auditiva e deformações articulares também são comuns (BRASIL; PEREIRA; MOREIRA; et al., 2016a), o que está geralmente ligado à ocorrência de comprometimento no neurodesenvolvimento pós-natal, como retardo mental, distúrbios

convulsivos, alterações no tônus muscular, deficiência motora grave, dificuldades de aprendizado, disfagia, entre outros (DA SILVA; GANZ; SOUSA; et al., 2016; FREITAS; SOUZA-SANTOS; CARVALHO; et al., 2020).

A frequência de ocorrência da SCZ permanece indefinida e parece variar de acordo com alguns fatores, como genética da população e localização geográfica (BRASIL; PEREIRA; MOREIRA; et al., 2016a; TERRITORIES; VANMALDEGHEM; PRADO; et al., 2017; BARBEITO-ANDRÉS; SCHULER-FACCINI; GARCEZ, 2018). Fatores socioeconômicos e nutricionais também têm sido relacionados à SCZ (BARBEITO-ANDRÉS; PEZZUTO; HIGA; et al., 2020).

De maneira geral, a transmissão vertical do vírus *Zika* é frequente, mas a confirmação laboratorial da infecção na mãe não é necessariamente associada com o nascimento de crianças com anormalidades (BRASIL; VASCONCELOS; KERIN; et al., 2020), o que reforça a proposição de que fatores de risco adicionais sejam necessários para a ocorrência da SCZ. Ainda não existe consenso também acerca da influência do trimestre da gestação em que a infecção pelo vírus *Zika* acontece e a ocorrência da SCZ. Estudos apontam para um percentual maior de danos neurológicos quando a infecção ocorre no primeiro trimestre da gestação, contudo, importantes efeitos deletérios para a criança foram relatados independentemente da idade gestacional (CAUCHEMEZ; BESNARD; BOMPARD; et al., 2016; TERRITORIES; VANMALDEGHEM; PRADO; et al., 2017; NIELSEN-SAINES; BRASIL; KERIN; et al., 2019; BRASIL; VASCONCELOS; KERIN; et al., 2020).

Os resultados a longo prazo da infecção congênita pelo vírus *Zika* em crianças que nasceram aparentemente normais permanecem indefinidos. Nielsen-Saines e colaboradores, avaliando alterações no neurodesenvolvimento de crianças expostas ao vírus *Zika* intraútero até o segundo ano de vida, mostraram que a maioria das crianças expostas permaneceu assintomática aos 2 anos de idade, o que sugere que apenas uma minoria de recém-nascidos aparentemente normais desenvolverá sintomas de início tardio. Contudo, a ocorrência de microcefalia tardia e transtornos do espectro autista foram relatados, entre outras anormalidades (NIELSEN-SAINES; BRASIL; KERIN; et al., 2019). Nesse sentido, Hcini e colaboradores, avaliando alterações no neurodesenvolvimento de crianças infectadas por vírus *Zika* intraútero até o 3 anos de idade, sugerem que a infecção intraútero esteja associada a risco aumentado de desenvolvimento de problemas neurológicos a longo prazo, mesmo para as crianças que nasceram sem anormalidades (HCINI; KUGBE; RAFALIMANANA; et al., 2021).

Esses achados mostram o quão impactante a infecção pelo vírus *Zika* pode ser e concordam com necessidade de estudos que avaliem fatores de risco associados à ocorrência da SCZ. Além disso, sugerem a necessidade de acompanhamento multidisciplinar a longo prazo para as crianças que nasceram de mães infectadas pelo vírus *Zika* durante a gestação, visando uma completa elucidação do panorama no qual esta infecção congênita está inserida, como também a promoção de atenção básica necessária e melhor qualidade e expectativa de vida às crianças acometidas (NIELSEN-SAINES; BRASIL; KERIN; et al., 2019; HCINI; KUGBE; RAFALIMANANA; et al., 2021; PAIXAO; CARDIM; COSTA; et al., 2022).

## **2.2 Aspectos imunológicos associados às infecções pelo vírus *Zika***

A RI desenvolvida durante a infecção por *Zika* 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 e ocorrência da SCZ, no entanto, a participação de diversos mecanismos da RI inata e adaptativa têm sido demonstrados (PIERSON; DIAMOND, 2018).

Eventos da RI inata que interferem no reconhecimento do vírus *Zika* e no controle inicial da 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- $\alpha$ ) e beta (IFN- $\beta$ ), 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 isso, outro estudo mostrou que a produção de Interferon (IFN) tem função antiviral frente à infecção pelo vírus *Zika* 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 vírus *Zika* à RI inata (GRANT; PONIA; TRIPATHI; et al., 2016) e, além disso, o vírus *Zika* parece ter como alvo de infecção células que não possuem uma RI inata naturalmente eficiente, como as células progenitoras neurais (PIERSON; DIAMOND, 2018). A principal hipótese para a surgimento dos resultados neurológicos adversos que caracterizam a SCZ é que o vírus *Zika* pode infectar e atravessar as células da placenta, atingindo o sistema neurológico fetal e causando danos. Assim, a infecção pelo vírus *Zika* causa um desequilíbrio na RI inata, inflamação excessiva e disfunção da permeabilidade vascular da placenta, o que pode contribuir para prejudicar o desenvolvimento do SNC do feto (DE NORONHA; ZANLUCA; AZEVEDO; et al., 2016; HIRSCH;

ROBERTS; GRIGSBY; et al., 2018; RABELO; DE SOUZA; SALOMÃO; et al., 2020; AZAMOR; CUNHA; DA SILVA; et al., 2021).

Em relação à resposta imune adaptativa, estudos têm demonstrado as respostas mediadas por células T frente à infecção por vírus *Zika*, porém pouco se sabe sobre como ela ocorre em humanos. De maneira geral, os dados apontam para a geração de uma imunidade celular robusta e duradoura. Foi demonstrado que, em camundongos, a ativação de linfócitos TCD8<sup>+</sup> podem reduzir a carga viral e que a depleção dos linfócitos TCD8<sup>+</sup> ou deficiências genéticas nestas células levam ao aumento da carga viral frente à infecção por vírus *Zika* (ELONG NGONO; VIZCARRA; TANG; et al., 2017). Também em modelo murino, foi demonstrado que a estimulação com o vírus *Zika* induziu uma polarização de respostas para o perfil Th1, com a produção de citocinas como IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2, e que células T CD4<sup>+</sup> são necessárias principalmente para a geração de uma resposta humoral efetiva específica contra o vírus *Zika*, mas não para uma resposta eficiente de linfócitos T CD8<sup>+</sup> (ELONG NGONO; YOUNG; BUNZ; et al., 2019). Avaliando o perfil de células T multifuncionais de pacientes dois anos após a infecção por *Zika*, Neto e colaboradores (2020) observaram um forte perfil pro inflamatório contra antígenos do vírus *Zika*, especialmente células T produzindo IFN- $\gamma$  e IL-17A, assim como a participação da citocina regulatória IL-10. Ademais, foi demonstrada uma variação no perfil de produção de citocinas entre as células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> de acordo com o peptídeo do vírus *Zika* utilizado no estímulo (PEREIRA NETO; GONÇALVES-PEREIRA; DE QUEIROZ; et al., 2020).

O impacto da imunidade prévia a outros flavivírus, especialmente *Dengue*, frente à infecção por vírus *Zika* na dinâmica das células TCD4<sup>+</sup> também tem sido alvo de estudos, o que traz implicações importantes para os países em que ocorre circulação de diferentes arbovírus, como no Brasil. Foi demonstrado que células T de memória primadas para *Dengue* por infecção natural ou vacinação reconhecem peptídeos do vírus *Zika* e modulam a magnitude e qualidade da RI, propiciando um controle mais eficiente frente a infecção por vírus *Zika* (GRIFONI; PHAM; SIDNEY; et al., 2017). Coadunando com estes resultados, Wen, Wang, Valentine et al. (2020) demonstraram, a partir de experimentos com camundongos, que células T CD4<sup>+</sup> com reatividade cruzada para *Dengue/Zika* quando infectadas pelo vírus *Zika* produzem uma resposta com citocinas do perfil Th1 eficientes e podem suprimir a replicação do vírus *Zika* de maneira não dependente de anticorpos do tipo IgG (WEN; WANG; VALENTINE; et al., 2020). Contudo, estudo prévio do nosso grupo demonstrou que mães que tiveram crianças com SCZ durante os anos de 2015 e 2016 no Brasil apresentam evidência de imunidade sorológica prévia ao vírus da *Dengue*, sugerindo

que a microcefalia, desfecho mais preocupante das infecções pelo vírus *Zika*, pode ocorrer em mães imunes ao *Dengue* (REYNOLDS; WATBER; SANTOS; et al., 2020).

O funcionamento das células B frente à infecção por *Zika* também vem sendo elucidado. A detecção de anticorpos IgM contra o vírus *Zika* 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 vírus *Dengue*, 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 o vírus *Zika*, demonstrada quando comparada com a resposta de indivíduos nunca infectados com outros flavivírus (ROGERS et al., 2017; STETTLER, et al., 2016). Além disso, essa reatividade cruzada a antígenos aumenta a complexidade de desenvolvimento de diagnósticos sorológicos específicos e gera especulações acerca das implicações para a proteção ou patogênese das doenças causadas pelo vírus *Zika*. Outros estudos também apontam para uma eficiente memória imunológica desenvolvida pós infecção pelo vírus *Zika*. Assim, a prevalência de indivíduos sorologicamente positivos para o vírus *Zika* vem sendo relacionada ao decréscimo no número de casos da doença após o surto inicial no Brasil em 2015 (NETTO; MOREIRA-SOTO; PEDROSO; et al., 2017).

Alguns biomarcadores da RI já foram descritos como característicos da infecção por *Zika* 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 TNF $\alpha$  mostraram-se aumentados em mulheres grávidas que foram infectadas pelo vírus *Zika* e gestavam crianças com malformações congênitas, quando comparadas com as que gestavam crianças normais, as quais apresentaram aumento de fator de crescimento nervoso do tipo beta ( $\beta$ 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 *Zika* (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 pelo vírus *Zika* induzindo anomalias fetais (FOO; CHEN; CHAN; et al., 2018). A avaliação de tecido cerebral de casos fatais de microcefalia causada pela infecção pelo vírus *Zika* mostrou alta expressão de vários marcadores de apoptose e de citocinas pró e anti-inflamatórias, como TNF $\alpha$ , interleucina-IL-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), fator transformador de crescimento-

$\beta$  (TGF- $\beta$ ) e interleucina-33 (IL-33) (DE SOUSA; AZEVEDO; MARTINS FILHO; 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 vírus *Zika*.

### 3 SNPs E SUSCEPTIBILIDADE ÀS INFECÇÕES VIRAIS

Dentre os fatores genéticos, os SNPs são variações intraespécies caracterizadas por uma variação 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, quando funcionais, podem levar à diferenças fenotípicas relevantes para a área da saúde, uma vez que podem determinar variações na produção de proteínas, quando situados em regiões de regulação gênica ou afetar as funções da proteína produzida, quando situados em região de codificação gênica (ALBERTS, JOHNSON, LEWINS, 2017).

Os produtos dos genes envolvidos na RI inata e adaptativa podem estar sob influência de SNPs e a existência destes ajuda a explicar a susceptibilidade ou resistência à 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).

Neste ínterim, a literatura tem demonstrado importante participação de SNPs em diversas doenças infecciosas, incluindo infecções virais.

#### 3.1 Papel dos SNPs na resposta imune ao vírus *Zika*

Pouco se conhece a respeito dos fatores do hospedeiro que regulam a susceptibilidade às infecções pelo vírus *Zika* e ocorrência da SCZ. Contudo, por se tratar de doença multifatorial, espera-se que as infecções e o desenvolvimento das formas mais graves 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 pelo vírus *Zika* 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 *Zika in*

*vitro*, quando comparadas com células dos gêmeos não acometidos. Assim, possíveis variações gênicas pontuais funcionais nos gêmeos com microcefalia parecem ser importantes e podem explicar a patogênese causada pelo vírus *Zika*, levando a diferentes respostas frente à infecção.

Poucos estudos têm demonstrado associação entre variantes do tipo SNP e a SCZ. Estudo recente, realizado a partir do sequenciamento do exoma de mães de crianças com SCZ que foram infectadas pelo vírus *Zika* 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 o vírus *Zika* 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 vírus *Zika* (ROSSI; FAUCZ; MELO; et al., 2018).

Porém, SNPs localizados em outras regiões gênicas como íntrons ou em regiões intergênicas de regulação, 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 *Zika*, podem ajudar a elucidar a patogênese da doença. Nesse sentido, artigo prévio do grupo mostrou importante associação de SNP funcionais nos genes receptor Toll-like 3 (TLR3) e TNF $\alpha$ , com a ocorrência e gravidade da SCZ, reforçando a relevância de fatores genéticos na patogênese das infecções causadas pelo vírus *Zika* (SANTOS; RIBEIRO; ALVES; et al., 2019). Posteriormente, o papel de variações nos genes interferon- $\lambda$  (IFN- $\lambda$ ), óxido nítrico sintetase-2 (NOS2) foram também sugeridos (AZAMOR; CUNHA; DA SILVA; et al., 2021; GOMES; SGARIONI; BOQUETT; et al., 2021; ROSSI; FAUCZ; MELO; et al., 2021).

Dentre as vantagens de um estudo genético está a 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.

Estes achados na literatura sugerem que diferentes genes atuam na susceptibilidade à infecção em diferentes populações e reforçam a necessidade de replicação de estudos

avaliando aspectos genéticos na infecção pelo vírus *Zika*. Nesse contexto, a avaliação de SNPs funcionais em genes da imunidade inata envolvidos na RI à vírus ajudam na compreensão de quais fatores genéticos estão ligados à ocorrência da SCZ.

## 4 OBJETIVOS

### 4.1. Geral

Avaliar a associação entre polimorfismos de nucleotídeo único em genes candidatos com infecção pelo vírus *Zika* e a ocorrência da síndrome congênita do *Zika*.

- *Hipótese: Polimorfismos genéticos em genes candidatos, importantes para a resposta imune a vírus, estão associados à ocorrência e gravidade da síndrome congênita do Zika.*

### 4.2. Específicos

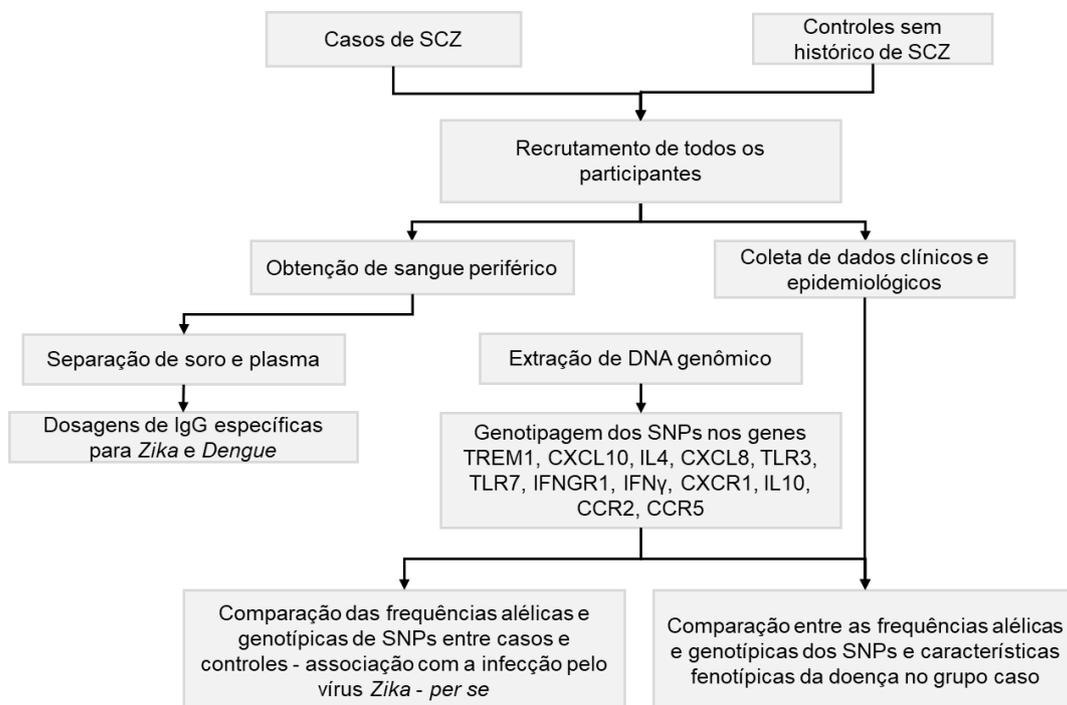
1. Avaliar aspectos epidemiológicos e clínicos associados à infecção pelo vírus *Zika* e à ocorrência de SCZ;
2. Comparar as frequências alélicas e genótípicas de SNPs nos genes TREM1, CXCL10, IL4, CXCL8, TLR3, TLR7, IFNR1, IFN $\gamma$ , CXCR1, IL10, CCR2 e CCR5 em indivíduos expostos à infecção pelo vírus *Zika*;
3. Verificar a associação de SNPs nos genes TREM1, CXCL10, IL4, CXCL8, TLR3, TLR7, IFNR1, IFN $\gamma$ , CXCR1, IL10, CCR2 e CCR5 com a ocorrência da SCZ;
4. Analisar diferenças genéticas do tipo SNPs entre crianças com microcefalia, com quadros clínicos de diferentes gravidades.

## 5 MATERIAIS E MÉTODOS

### 5.1 Delineamento do estudo e desenho experimental

Trata-se de um estudo de caso-controle retrospectivo. As metodologias utilizadas para a elucidação dos objetivos estão agrupadas de acordo com o desenho experimental exposto abaixo.

#### 5.1.1 Desenho experimental dos objetivos específicos



## 5.2 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*” (com Certificado de Apresentação de Apreciação Ética 54835916.2.0000.5546 e parecer número 1.486.302).

## 5.3 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 Sergipanos de Aracaju, Nossa Senhora do Socorro, Itabaiana e Campo do Brito.

## 5.4 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 pelo *vírus Zika*. 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 pelo *vírus Zika* incluíram crianças com microcefalia, nascidas durante a epidemia do *vírus Zika* (de julho de 2015 a março de 2017) e suas mães. 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. O recrutamento de todos os indivíduos inclusos no estudo e a coleta das amostras biológicas dos mesmos foram realizadas durante o período de julho de 2016 a agosto de 2019.

Foram recrutados:

- Grupo caso:
  - Mães de crianças com microcefalia associada à infecção por *vírus Zika* (M-MICRO);
  - Crianças com microcefalia associada à infecção por *vírus Zika* \*(C-MICRO).  
\*Indivíduos nessa categoria podem apresentar outras malformações em adição à microcefalia
- Grupo controle:
  - Mães de crianças de área endêmica às infecções por *vírus Zika*, que tiveram filhos sem microcefalia, nascidos no mesmo período do surto de *vírus Zika* (M-CT);
  - Crianças saudáveis de área endêmica a infecção por *vírus Zika*, que nasceram no mesmo período do surto de *vírus Zika* (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, serão utilizadas as siglas descritas acima para discriminar os respectivos grupos.

#### 5.4.1 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 prévia por *vírus Zika* foi confirmada pela detecção de imunoglobulinas do tipo IgG para o *vírus Zika*, por Ensaio de Imunoabsorção enzimática (ELISA), descrito no item 5.5.6.1.

Os pacientes que recusaram 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 *Zika* negativo também foram excluídos deste estudo. O diagnóstico negativo refere-se à não-deteção de imunoglobulinas do tipo IgG para o *vírus Zika* pelas técnicas descritas no item 5.5.6.1. Os pacientes excluídos do estudo continuaram a ser beneficiados com o tratamento e acompanhamento devidos nos ambulatórios do HU-UFS. Diagnósticos e exames clínicos e laboratoriais 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 descartadas por meio de investigação clínica e testes sorológicos.

## **5.5 Metodologias dos objetivos específicos**

### **5.5.1 Coleta de informações clínico-epidemiológicas**

Informações clínico-epidemiológicas foram coletadas por meio de entrevista semiestruturada a partir de questionário (APÊNDICE B) aplicado pelos pesquisadores responsáveis pelo estudo. Alguns dados complementares também foram obtidos por meio de busca ativa em prontuários disponíveis no HU-UFS.

### **5.5.2 Obtenção de soro e plasma**

Por meio de venipuntura, 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. As amostras de soro e plasma obtidas foram estocadas a -80 °C até o uso.

### **5.5.3 Obtenção de DNA genômico**

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 ou utilizando amostras de 200 µL de sangue

total coletado em tubos contendo anticoagulante EDTA K2, foi extraído o DNA genômico (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 às amostras lisadas, e estas foram incubadas à temperatura ambiente por 1 minuto. Em seguida, foi adicionado a cada amostra 200 µL do tampão de hemólise, e as amostras 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 centrifugada a 10.000g por 1 min, à temperatura ambiente, em coluna de centrifugação baseada em sílica, disponível no kit. Em seguida, as amostras de gDNA retidas na coluna foram lavadas por meio da adição do tampão de lavagem 1 e centrifugadas a 10.000g 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 de 80 µL do tampão de eluição do kit e foram submetidas à centrifugação por 1 min à 16.000g, à temperatura ambiente. Ao fim do processo de eluição, se obteve gDNA purificado.

#### 5.5.4 Quantificação do gDNA

Após a extração realizada conforme o item 5.5.3, 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 ng/µL, 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 estocadas a -80 °C até análise. A quantidade e a pureza do DNA foram utilizadas como parâmetros para a realização da Reação em Cadeira da Polimerase em Tempo Real (qPCR – do inglês *Quantitative polymerase chain reaction*).

#### 5.5.5 Genotipagem dos SNPs por qPCR

As amostras de gDNA, obtidas seguindo a metodologia explicitada no item 5.5.3 foram diluídas, em água livre de nucleases, para a concentração final de 50 ng/µL. 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 µL das amostras diluídas de gDNA foram distribuídas em placa de 96 poços, juntamente com 1 µL de água livre de nucleases, 5,5 µL de TaqMan® Genotyping Master Mix e 0,5 µL de sonda de discriminação alélica TaqMan® SNP Genotyping específicas para cada gene avaliado por poço (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. Os SNP avaliados foram selecionados por serem funcionais, terem sido associados à outras doenças infecciosas e ocorrerem em genes importantes para a RI contra vírus.

**Quadro 01** Identificação e informações gerais dos SNPs avaliados. Gene, identificação do SNP, localização cromossômica e região gênica, tipo de troca de base, frequência do alelo alternativo e ensaios de sondas TaqMan® utilizados nesse estudo

Gene	SNP ID	Cromossomo / Localização	Tipo de substituição do SNP	FAA*	FAA**	Cód. Comercial do ensaio
TREM1	rs2234246	Chr.6/ 3' UTR	Transição	T = 50%	T = 43%	C__1165058_20
CXCL10	rs4508917	Chr.4/ Intron	Transição	G = 32%	G = 29%	C__497053_10
IL4	rs2243250	Chr.5/ <i>Upstream</i>	Transição	T = 29%	T = 34%	C__16176216_10
CXCL8	rs4073	Chr.4/ <i>Upstream</i>	Transversão	T = 51%	T = 46%	C__11748116_10
TLR3	rs3775290	Chr.4/ Intragênica	Transição	T = 28%	T = 27%	C__11785995_20
TLR7	rs179008	Chr.X/ Intragênica	Transição	T = 18%	T = 18%	C__2259574_10
IFNR1	rs2234711	Chr.6/ 5' UTR	Transição	G = 44%	G = 43%	C__11693991_10
IFN $\gamma$	rs181407537	Chr.12/ 5' UTR	Transição	C = 0.1%	C = 0.06%	C__176992733_10
CXCR1	rs2854386	Chr.2/ <i>Downstream</i>	Transversão	C = 89%	C = 86%	C__15826161_10
IL10	rs1800871	Chr.1/ <i>Upstream</i>	Transição	G = 67%	G = 69%	C__1747362_10
	rs1800872	Chr.1/ <i>Upstream</i>	Transversão	G = 67%	G = 67%	C__1747363_10
	rs1800896	Chr.1/ Intragênica	Transição	C = 35%	C = 40%	C__1747360_10
CCR2	rs1799864	Chr.3/ Intragênica	Transição	A = 13%	A = 12%	C__64650303_10
CCR5	rs1800023	Chr.3/ Intron	Transição	G = 35%	G = 30%	C__9698604_20
	rs1800024	Chr.3/ Intron	Transição	T = 14%	T = 13%	C__64650310_10
	rs1799987	Chr.3/ Intron	Transição	G = 47%	G = 49%	C__11988176_10
	rs1799988	Chr.3/ Intron	Transição	T = 47%	T = 49%	C__11988170_20

\*Frequência do alelo alternativo na população brasileira (ABraOM database); \*\* Frequência global do alelo alternativo (gnomAD database). Disponível em: <<https://abraom.ib.usp.br/>>, <<https://gnomad.broadinstitute.org/>>, <<https://www.thermofisher.com/br/en/home.html>>.

### 5.5.6 Diagnóstico da infecção pelo vírus *Zika*

O diagnóstico das amostras obtidas conforme o item 5.5.2 foi realizado através de ensaio sorológico ELISA.

### 5.5.6.1 Diagnóstico por sorologia - ELISA

Para a detecção de anticorpos específicos contra o vírus *Zika* 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. Para diagnóstico diferencial das infecções pelo vírus *Zika*, por conta da endemicidade e semelhança dos sintomas compartilhadas com infecção pelo vírus *Dengue*, foi utilizado Anti-*Dengue* Vírus IgG (Euroimmun, Medizinische Labordiagnostika AG®). 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 ≥ 0,8 a < 1,1) ou positiva (razão ≥ 1,1).

### 5.5.7 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 associações entre a ocorrência de SCZ e os SNPs foram avaliadas comparando os grupos caso e controle por meio de regressão logística univariada usando o software R (versão 3.4), com o pacote “SNPassoc” e/ou através do software GraphPad Prism 7 (Graphpad software, San Diego, CA, USA), utilizando o teste de Qui-quadrado ( $X^2$ ) ou o teste Exato de Fisher, com cálculo de *Odds Ratio*. 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, foram feitas diferentes combinações de acordo com diferentes modelos de análises, considerando as variáveis dependentes e independentes para cada parâmetro analisado. 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 pelo vírus *Zika* e à gravidade da microcefalia.

As variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos usando o teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney.

## 6 RESULTADOS

### 6.1 Características clínico-epidemiológicas

As características dos pacientes incluídos neste estudo são mostradas na Tabela 1. Seguindo os critérios estabelecidos no item 5.4, foram incluídos um total de 151 indivíduos no grupo caso, sendo 75 M-MICRO e 76 C-MICRO, e 94 indivíduos no grupo controle, sendo 47 M-CT e 47 C-CT. A variação de idade entre o grupo M-MICRO e o grupo M-CT foi de 14 – 40 anos, com uma média de 25.4 e 24.3 anos, respectivamente (Tabela 1,  $p = 0.312$ ). Quanto à presença de sintomatologia, a maioria das mães que compuseram o M-MICRO foram sintomáticas (76%), enquanto no grupo M-CT, as mães sintomáticas foram minoria (25.53%) (Tabela 1, OR = 9.23; IC 95% = 3.95 – 20.71;  $p = <0.0001$ ). Os sintomas mais frequentes relatados foram exantema, febre e artralgia, com 80.70 %, 61.40% e 59.64% para o grupo M-MICRO e 50%, 66.66% e 58.33% para o grupo M-CT, respectivamente. Quanto ao período de ocorrência dos sintomas durante a gestação, na maioria das mães no grupo M-MICRO (50%) os sintomas ocorreram durante o primeiro trimestre de gestação, seguido por 36.84% no segundo trimestre e 13.16% no terceiro trimestre. Já, no grupo M-CT, o trimestre com maior ocorrência de sintomas foi o segundo (50%), seguido do primeiro trimestre (33.33%) e do terceiro (16.67 %) (Tabela 1,  $p = <0.748$ ).

**Tabela 1.** Informações clínico-epidemiológicas dos indivíduos incluídos no estudo de associação entre a síndrome congênita do *Zika* e polimorfismos de nucleotídeo único.

Variáveis	Grupo caso	Grupo controle	OR (IC 95%)	p
	M-MICRO (n = 75)	M-CT (n = 47)		
Total	(n = 75)	(n = 47)		
Idade	25.4 (14 - 40)	24.3 (14 - 40)		0.312
Ocorrência de sintomas				
Assintomático	18 (24)	35 (74.47)	9.23 (3.95 - 20.71)	<0.0001
Sintomático	57 (76)	12 (25.53)		
Sintomatologia durante a gestação (% em todas as sintomáticas)				
Febre	35 (61.40)	8 (66.66)	0.79 (0.24 - 2.77)	>0.999
Artralgia	34 (59.64)	7 (58.33)	1.05 (0.32 - 3.68)	>0.999
Exantema	46 (80.70)	6 (50.0)	4.18 (1.18 - 13.50)	0.058
Conjuntivite	4 (7.0)	0		>0.999
Mialgia	28 (49.12)	6 (50.0)	0.96 (0.27 - 3.38)	>0.999
Dor Retro-orbitaria	20 (35.1)	3 (25.0)	1.62 (0.43 - 6.02)	0.737
Linfadenopatia	7 (12.28)	2 (16.66)	0.70 (0.14 - 3.74)	0.650
Prurido	7 (12.28)	0		0.340
Trimestre de ocorrência da sintomatologia da infecção por ZIKV *				
1º trimestre	19/ 38 (50.0)	2/ 6 (33.33)		0.748
2º trimestre	14/ 38 (36.84)	3/ 6 (50.0)		
3º trimestre	5/ 38 (13.16)	1/ 6 (16.67)		
IgG ZIKV				
Positivo	71 (94.67)	19 (40.43)		
Negativo	0	20 (42.56)		
Borderline	4 (5.33)	4 (8.5)		
IgG DENV				
Positivo	68 (90.67)			
Negativo	4 (5.33)			
Borderline	3 (4.0)			
Total	C-MICRO (n = 76)	C-CT (n = 47)		
Sexo (%)				
Feminino	41 (53.95)	17 (36.17)	2.06 (0.95 - 4.44)	0.064
Masculino	35 (46.05)	30 (63.83)		
Classificação do PC ao nascimento				
Adequado para a idade	0	44 (100)		
Microcefalia grave (CMG)**	42/ 60 (70.0)	0		
Microcefalia (CM)**	18/ 60 (30.0)	0		
Período de nascimento	Jul. 2015 - Mar. 2017	Abr. 2015 - jul. 2017		

M-MICRO, mães que tiveram crianças com síndrome congênita do *Zika*; M-CT, mães que vivem em áreas endêmicas do *Zika*, que tiveram crianças saudáveis durante o surto do *vírus Zika*; C-MICRO, crianças com síndrome congênita do *Zika*; C-CT, crianças saudáveis nascidas de mães residentes em áreas endêmicas do *vírus Zika*; PC = Perímetro cefálico. \*Não foi possível obter a informação de todos os participantes. A informação sobre o trimestre da infecção pelo *vírus Zika* durante a gravidez não estava disponível ou as mães responderam que não se lembravam. \*\*Indivíduos desta categoria podem apresentar outras malformações além da microcefalia. As variáveis quantitativas foram comparadas entre os grupos usando o teste t de Student ou o teste

U de Mann-Whitney e são apresentadas como valor médio, mínimo e máximo; As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher; Negrito indica estatisticamente significativo.

Em relação às crianças incluídas no estudo, o grupo C-MICRO foi composto 53.95% pelo sexo feminino e 46.05% pelo sexo masculino, enquanto o grupo C-CT foi composto por 36.17% e 63.83% para os sexos feminino e masculino, respectivamente (Tabela 1, OR = 2.06; IC 95% = 0.95 - 4.44;  $p = 0.064$ ).

Quanto à classificação do PC ao nascimento, a maioria das crianças do grupo C-MICRO nasceram com microcefalia grave (70%), enquanto 30% delas nasceram com microcefalia, de acordo com a classificação explicitada no item 2.2.4 (Tabela 1). No grupo C-CT todas as crianças nasceram com o PC adequado para a idade gestacional. Não houve diferenças significativas entre o período de nascimento das crianças incluídas nos grupos caso e controle (Tabela 1).

**Tabela 2.** Variáveis clínico-epidemiológicas nos casos de síndrome congênita do Zika estratificados pela gravidade da microcefalia

Variáveis	CMG** (n = 42)	CM** (n = 18)	p
<b>Sexo</b>			
Feminino (%)	23 (54.76)	10 (55.6)	>0.999
Masculino (%)	19 (45.24)	8 (44.4)	
<b>Peso (g)</b>	n = 24	n = 5	
	2.57 (1.30 - 3.70)	3.18 (2.95 - 3.40)	<b>0.004</b>
<b>Comprimento (cm)</b>	n = 21	n = 5	
	45.2 (34.0 - 49.0)	48.4 (47.0 - 49.0)	<b>0.006</b>
<b>Duração da gestação</b>	n = 40	n = 18	
Pré-termo	2 (5)	2(11.11)	
Termo	36 (90)	15 (83.33)	
Pós-termo	2 (5)	1 (5.56)	0.689
<b>Presença de sintomas da infecção por ZIKV na mãe</b>	n = 42	n = 18	
Sintomática (%)	34 (80.96)	11 (61.11)	
Assintomática (%)	8 (19.04)	7 (38.89)	0.118
<b>Trimestre de ocorrência da sintomatologia da infecção por ZIKV</b>	n = 24	n = 7	
1st	12 (50)	5 (71.42)	
2nd	8(33.33)	1 (14.29)	
3rd	4 (16.67)	1 (14.29)	0.562
<b>Perímetro cefálico ao nascimento (cm)</b>	28.25 (22.5 - 30.0)	31.0 (30.0 - 34.0)	<b>&lt;0.0001</b>

CMG, crianças com microcefalia grave devido à síndrome congênita do Zika; CM, crianças com microcefalia devido à síndrome congênita do Zika; A informação sobre o trimestre de infecção pelo vírus Zika durante a gravidez não estava disponível ou as mães responderam que não lembravam; Pré-termo: menos de 259 dias (37 semanas), termo: 259–293 dias (37–41 semanas), pós-termo: 294 dias (42 semanas) ou mais; As variáveis

quantitativas foram comparadas entre os grupos usando o teste t de Student ou o teste U de Mann-Whitney e são apresentadas como valor médio, mínimo e máximo; As variáveis categóricas foram comparadas entre os grupos por meio do teste Qui-quadrado ou teste Exato de Fisher; Negrito indica estatisticamente significativo. \*\*Indivíduos desta categoria podem apresentar outras malformações além da microcefalia.

A fim de caracterizar melhor o grupo C-MICRO, as crianças com microcefalia (CM) e com microcefalia grave (CMG) foram avaliadas. Foram encontradas diferenças significativas entre os grupos no tamanho do perímetro cefálico ao nascer (Tabela 2,  $p = <0.0001$ ), peso ao nascer (Tabela 2,  $p = 0.004$ ) e comprimento ao nascer (Tabela 2,  $p = 0.006$ ). As diferenças existentes entre os grupos quanto a duração da gestação, presença de sintomatologia nas mães durante a gestação e trimestre de ocorrência dos sintomas relacionados à infecção pelo *vírus Zika* não foram significativas (Tabela 2).

## **6.2 Distribuição e comparação das frequências alélicas e genótípicas para os SNPs analisados.**

O teste de EHW mostrou desvio de equilíbrio na população controle para os SNPs CXCL10 rs4508917, TLR7 rs179008 e IL10 rs1800896 (Tabela 3). A frequência do alelo alternativo para o SNP IFN $\gamma$  rs181407537 é menor do que 0.5 (Quadro 01), por isso este SNP foi excluído das demais análises. As frequências alélicas e genótípicas totais de todos os SNP analisados (Quadro 01) estão listadas na Tabela 4.

A avaliação da associação entre os grupos não encontrou diferenças entre as frequências genótípicas e alélicas para os SNPs analisados nos genes, TLR3, TLR7, IFNGR1, CXCR1, IL10, CCR2, CCR5, quando comparadas entre M-MICRO versus (vs) M-CT e C-MICRO vs C-CT.

**Tabela 3.** Teste de EHW na população controle para os polimorfismos de nucleotídeo único estudados.

Gene	SNP	Grupo controle
		<i>p</i>
TREM1	rs2234246	0.1802
CXCL10	rs4508917	<b>0.0066</b>
IL4	rs2243250	0.1391
CXCL8	rs4073	0.5380
TLR3	rs3775290	0.2420
TLR7	rs179008	<b>0.0017</b>
IFNR1	rs2234711	0.6803
IFN $\gamma$	rs181407537	-
CXCR1	rs2854386	0.5926
IL10	rs1800871	0.2579
	rs1800872	0.6475
	rs1800896	<b>0.0000</b>
CCR2	rs1799864	1.0000
CCR5	rs1800023	0.2117
	rs1800024	1.0000
	rs1799987	0.4063
	rs1799988	0.1450

A população está em EHW quanto à distribuição alélica e genotípica quando  $p > 0.025$ .

**Tabela 4** Frequências alélicas e genotípicas totais de todos os polimorfismos de nucleotídeo único analisados

Frequências alélicas e genotípicas (%) <sup>a</sup>					
Gene	Grupo caso		Grupo controle		
	M-MICRO	C-MICRO	M-CT	C-CT	
	n = 73	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>TREM1 rs2234246</b>	CC	17 (23,29)	16 (21,05)	3 (6,38)	6 (12,77)
	CT	41 (56,16)	41 (53,95)	31 (65,96)	20 (42,55)
	TT	15 (20,55)	19 (25)	13 (27,66)	21 (44,68)
	C	75 (51,37)	73 (48,03)	37 (39,36)	32 (34,04)
	T	71 (48,63)	79 (51,97)	57 (60,64)	62 (65,96)
	n = 73	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>CXCL10 rs4508917</b>	AA	38 (52,05)	37 (48,68)	29 (61,70)	32 (68,09)
	AG	27 (36,99)	29 (38,16)	13 (27,66)	10 (21,28)
	GG	8 (10,96)	10 (13,16)	5 (10,64)	5 (10,64)
	A	103 (70,55)	103 (67,76)	71 (75,53)	74 (78,72)
	G	43 (29,45)	49 (32,24)	23 (24,47)	20 (21,28)
	n = 75	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>IL4 rs2243250</b>	CC	40 (53,33)	40 (52,63)	18 (38,30)	18 (38,30)
	TC	26 (34,67)	27 (35,53)	18 (38,30)	20 (42,55)
	TT	9 (12,00)	9 (11,84)	11 (23,40)	9 (19,15)
	C	106 (70,67)	107 (70,39)	54 (57,45)	56 (59,57)
	T	44 (29,33)	45 (29,61)	40 (42,55)	38 (40,43)
	n = 73	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>CXCL8 rs4073</b>	AA	28 (38,36)	29 (38,16)	16 (34,04)	11 (23,40)
	AT	32 (43,84)	28 (36,84)	23 (48,94)	27 (57,45)
	TT	13 (17,81)	19 (25)	8 (17,02)	9 (19,15)
	A	88 (60,27)	86 (56,58)	55 (58,51)	49 (52,13)
	T	58 (39,73)	66 (43,42)	39 (41,49)	45 (47,87)

		n = 73	n = 76	n = 47	n = 47
<b>TLR3 rs3775290</b>	CC	43 (58,90)	39 (51,32)	23 (48,94)	23 (48,94)
	CT	26 (35,62)	33 (43,42)	19 (40,43)	17 (36,17)
	TT	4 (5,48)	4 (5,26)	5 (10,64)	7 (14,89)
	C	112 (76,71)	111 (73,03)	65 (69,15)	63 (67,02)
	T	34 (23,29)	41 (26,97)	29 (30,85)	31 (32,98)
<b>TLR7 rs179008</b>	AA	51 (69,86)	57 (75)	31 (65,96)	37 (78,72)
	AT	19 (26,03)	12 (15,79)	14 (29,73)	4 (8,51)
	TT	3 (4,11)	7 (9,21)	2 (4,26)	6 (12,77)
	A	121 (82,88)	126 (82,89)	76 (80,85)	78 (82,98)
	T	25 (17,12)	26 (17,11)	18 (19,15)	16 (17,02)
<b>IFNGR1 rs2234711</b>	AA	19 (26,03)	19 (25)	12 (25,53)	11 (23,40)
	AG	39 (53,42)	42 (55,26)	24 (51,06)	26 (55,32)
	GG	15 (20,55)	15 (19,74)	11 (23,40)	10 (21,28)
	A	77 (52,74)	80 (52,63)	48 (51,06)	48 (51,06)
	G	69 (47,26)	72 (47,37)	46 (48,94)	46 (48,94)
<b>IFN<math>\gamma</math> rs181407537</b>	TT	73 (100)	76 (100)	47 (100)	47 (100)
	TC	0	0	0	0
	CC	0	0	0	0
	T	146 (100)	152 (100)	94 (100)	94 (100)
	C	0	0	0	0
<b>CXCR1 rs2854386</b>	CC	52 (71,23)	60 (78,95)	35 (74,47)	40 (85,11)
	CG	21 (28,77)	15 (19,74)	12 (25,53)	7 (14,89)
	GG	0	1 (1,32)	0	0
	C	125 (85,62)	135 (88,82)	82 (87,23)	87 (92,55)
	G	21 (14,38)	17 (11,18)	12 (12,77)	7 (7,45)

	n = 73	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>IL10 rs1800871</b>	AA	12 (16,44)	11 (14,47)	4 (8,51)	4 (8,51)
	AG	39 (53,42)	40 (52,63)	24 (51,06)	24 (51,06)
	GG	22 (30,14)	25 (32,89)	19 (40,43)	19 (40,43)
	A	63 (43,15)	62 (40,79)	32 (34,04)	32 (34,04)
	G	83 (56,85)	90 (59,21)	62 (65,96)	62 (65,96)
<b>IL10 rs1800872</b>	TT	12 (16,44)	11 (14,47)	4 (8,51)	5 (10,64)
	TG	38 (52,05)	40 (52,63)	23 (48,94)	21 (44,68)
	GG	23 (31,51)	25 (32,89)	20 (42,55)	21 (44,68)
	T	62 (42,47)	62 (40,79)	31 (32,98)	31 (32,98)
	G	84 (57,53)	90 (59,21)	63 (67,02)	63 (67,02)
<b>IL10 rs1800896</b>	TT	0	0	0	0
	TC	69 (94,52)	69 (90,79)	43 (91,49)	42 (89,36)
	CC	4 (5,48)	7 (9,21)	4 (8,51)	5 (10,64)
	T	69 (47,26)	69 (45,39)	43 (45,74)	42 (44,68)
	C	77 (52,74)	83 (54,61)	51 (54,26)	52 (55,32)
<b>CCR5 rs1800023</b>	AA	42 (57,53)	43 (56,58)	24 (51,06)	21 (44,68)
	AG	26 (35,62)	30 (39,47)	19 (40,43)	25 (53,19)
	GG	5 (6,85)	3 (3,95)	4 (8,51)	1 (2,13)
	A	110 (75,34)	116 (76,32)	67 (71,28)	67 (71,28)
	G	36 (24,66)	36 (23,68)	27 (28,72)	27 (28,72)
<b>CCR2 rs1799864</b>	AA	4 (5,48)	1 (1,32)	1 (2,13)	0
	AG	12 (16,44)	24 (31,58)	10 (21,28)	14 (29,79)
	GG	57 (78,08)	51 (67,11)	36 (76,60)	33 (70,21)
	A	20 (13,70)	26 (17,11)	12 (12,77)	14 (14,89)
	G	126 (86,30)	126 (82,89)	82 (87,23)	80 (85,11)

	n = 73	n = 76	n = 46	n = 45	
<b>CCR5 rs1799987</b>	AA	21 (28,77)	23 (30,26)	10 (21,74)	8 (17,78)
	AG	32 (43,84)	35 (46,05)	24 (52,17)	26 (57,48)
	GG	20 (27,40)	18 (23,68)	12 (26,09)	11 (24,44)
	A	74 (50,68)	81 (53,29)	44 (47,83)	42 (46,67)
	G	72 (49,32)	71 (46,71)	48 (52,17)	48 (53,33)
	n = 73	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>CCR5 rs1800024</b>	CC	58 (79,45)	50 (65,79)	34 (72,34)	32 (68,09)
	CT	11 (15,07)	25 (32,89)	11 (23,40)	15 (31,91)
	TT	4 (5,48)	1 (1,32)	2 (4,26)	0
	C	127 (86,99)	125 (82,24)	79 (84,04)	79 (84,04)
	T	19 (13,01)	27 (17,76)	15 (15,96)	15 (15,96)
	n = 73	n = 76	n = 47	n = 47	
<b>CCR5 rs1799988</b>	CC	26 (35,62)	24 (31,58)	17 (36,17)	15 (31,91)
	CT	27 (36,99)	34 (44,74)	18 (38,30)	21 (44,68)
	TT	20 (27,40)	18 (23,68)	12 (25,53)	11 (23,40)
	C	79 (54,11)	82 (53,95)	52 (55,32)	51 (54,26)
	T	67 (45,89)	70 (46,05)	42 (44,68)	43 (45,74)

M-MICRO, mães que tiveram crianças com síndrome congênita do *Zika*; M-CT, mães que vivem em áreas endêmicas do *vírus Zika*, que tiveram crianças saudáveis durante o surto de *vírus Zika*; C-MICRO, crianças com síndrome congênita do *Zika*; C-CT, crianças saudáveis nascidas de mães residentes em áreas endêmicas do *vírus Zika*.

### 6.2.1 Associação dos polimorfismos de nucleotídeo único TREM1 rs2234246, CXCL10 rs4508917, IL4 rs224325 e CXCL8 rs4073 com a síndrome congênita do *Zika*

**Tabela 5.** Frequência e distribuição de alelos e genótipos do polimorfismo de nucleotídeo único TREM1 rs2234246 e sua associação com a síndrome congênita do *Zika*.

Gene/SNP	Grupo Caso	Grupo Contole	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Grupo Caso	Grupo Controle	OR (IC 95%)	<i>p</i>
	M-MICRO	M-CT			C-MICRO	C-CT		
TREM1 rs2234246	<i>n</i> = 73	<i>n</i> = 47			<i>n</i> = 76	<i>n</i> = 46		
TT	15 (20.5) <sup>a</sup>	13 (27.7)			19 (25.0)	21 (45.7)		
CT	41 (56.2)	31 (66.0)	1.15 (0.48 - 2.76)	<b>0.035</b>	41 (53.9)	19 (41.3)	2.39 (1.04 - 5.44)	0.060
CC	17 (23.3)	3 (6.4)	4.91 (1.17 - 20.62)		16 (21.1)	6 (13.0)	2.95 (0.96 - 9.08)	
TT	15 (20.5)	13 (27.7)	1.48 (0.63 - 3.48)	0.371	19 (25.0)	21 (45.7)	2.52 (1.16 - 5.49)	<b>0.019</b>
CT+CC	58 (79.5)	34 (72.3)			57 (75.0)	25(54.3)		
TT+CT	56 (76.7)	44 (93.6)	4.45 (1.23 - 16.16)	<b>0.010</b>	60 (78.9)	40 (87.0)	1.78 (0.64 - 4.93)	0.255
CC	17 (23.3)	3 (6.4)			16 (21.1)	6 (13.0)		
C	75 (51.4)	37 (39.36)	1.62 (0.95 - 2.72)	0.084 <sup>b</sup>	73 (48.0)	32 (34.0)	1.79 (1.04 - 3.06)	<b>0.034<sup>b</sup></b>
T	71 (48.6)	57 (60.64)			79 (52.0)	62 (66.0)		
CC	17 (23.29)	3 (6.38)	4.91 (1.29 - 18.05)	<b>0.031<sup>b</sup></b>	16 (21.0)	6 (12.8)	2.94 (1.02 - 9.66)	0.066 <sup>b</sup>
TT	15 (20.55)	13 (27.66)			19 (25.0)	21 (44.7)		
log-Aditivo	73	47	1.87 (1.02 - 3.45)	<b>0.039</b>	76	46	1.85 (1.06 - 3.22)	<b>0.026</b>

<sup>a</sup>(%) número de indivíduos com o alelo ou genótipo especificado. Abreviaturas: M-MICRO, mulheres que deram à luz bebês com síndrome congênita do *Zika*; M-CT, mães que vivem em áreas endêmicas do *vírus Zika* que deram à luz bebês saudáveis; C-MICRO, crianças com síndrome congênita do *Zika*; C-CT, crianças saudáveis nascidas de mães residentes em áreas endêmicas do *vírus Zika*. Resultados de modelos de regressão logística univariada e teste Exato de Fisher<sup>b</sup>; Negrito indica estatisticamente significativo.

A comparação das frequências alélicas e genotípicas para os SNPs no gene TREM1 (Tabela 5), CXCL10, IL4 e CXCL8 (Tabela 6), mostraram diferenças significativas entre os grupos analisados.

O genótipo CC para o SNP rs2234246 no gene TREM1 foi mais frequente e associado às mães que tiveram crianças com microcefalia decorrente da infecção congênita por *vírus Zika* (M-MICRO) quando este grupo foi comparado ao grupo de mães controle (M-CT), com o modelo codominante de análise (Tabela 5,  $p = 0.05$ ). Essa associação foi mantida quando a comparação foi realizada com o modelo dominante de análise (CC vs. CT+TT) (Tabela 5, OR = 4.45; 95% IC = 1.24 -14.94;  $p = 0.022$ ) e entre os homozigotos (CC vs. TT) (Tabela 5, OR = 4.91; 95% IC = 1.29 -18.05;  $p = 0.031$ ). Na comparação entre o grupo caso de crianças com microcefalia (C-MICRO) e o grupo de crianças controle (C-CT), foi observada associação do SNP rs2234246 no gene TREM1 com a ocorrência da SCZ, tanto quando comparados os genótipos com presença de pelo menos um alelo C (CC + CT vs. TT), pelo modelo recessivo de análise, (Tabela 5, OR = 2.42; 95% IC = 1.11 -5.43;  $p = 0.029$ ), quanto avaliando a frequência alélica (Tabela 5, OR = 1.79; 95% IC = 1.04 -3.06;  $p = 0.034$ ). Em suma, foi observada uma maior frequência do alelo C nos grupos caso e uma maior frequência do alelo T nos grupos controle para o SNP rs2234246 no gene TREM1, tanto nas mães como nas crianças com microcefalia, na população estudada.

O alelo C para o gene IL4 rs224325 foi mais frequente no grupo M-MICRO do que no grupo M-CT quando as frequências alélicas foram comparadas (Tabela 6, OR = 1.78; 95% IC = 1.04 - 3.04;  $p = 0.038$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos de crianças C-MICRO e C-CT para este SNP quanto às frequências alélicas ou genotípicas em nenhum dos arranjos de análises realizados (Tabela 6). Adicionalmente, mães que têm os genótipos CC para o SNP TREM1 rs2234246 e genótipo com pelo menos um alelo C para o SNP IL4 rs224325 foram associadas com um aumento no risco de ocorrência de SCZ nas crianças (OR = 4.11; 95% IC = 1.134 - 13.87;  $p = 0.038$ ).

O SNP rs4508917 no gene CXCL10 também foi associado a ocorrência da microcefalia quando o grupo C-MICRO e o grupo C-CT foram comparados quanto a presença de pelo menos um alelo G (AG+GG vs. AA) no modelo recessivo de análise (Tabela 6, OR = 2.24; 95% IC = 1.02 -4.61;  $p = 0.041$ ), mostrando a maior frequência do G no grupo de crianças com microcefalia. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos M-MICRO e M-CT para este SNP quanto às frequências alélicas ou genotípicas em nenhum dos arranjos de análises realizados (Tabela 6). Ademais, o genótipo AA/TT para o SNP rs4073 no gene CXCL8 foi mais frequente no grupo de crianças com SCZ (Tabela 6).

**Tabela 6.** Frequência e distribuição de alelos e genótipos dos polimorfismos de nucleotídeo único CXCL10 rs4508917, IL4 rs2243250 e CXCL8 rs4073 SNP e suas associações com a síndrome congênita do *Zika*.

Gene/SNP	Grupo Caso M-MICRO	Grupo Controle M-CT	OR (IC 95%)	<i>p</i>	Grupo Caso C-MICRO	Grupo Controle C-CT	OR (95% CI)	<i>p</i>
<b>CXCL10 rs4508917</b>	<i>n</i> = 73	<i>n</i> = 47			<i>n</i> = 76	<i>n</i> = 47		
AA	38 (52.1)	29 (61.7)			37 (48.7)	32 (68.1)		
AG	27 (37.0)	13 (27.7)	1.59 (0.70 - 3.60)	0.538	29 (38.2)	10 (21.3)	2.51 (1.06 - 5.93)	0.089
GG	8 (11.0)	5 (10.6)	1.22 (0.36 - 4.13)		10 (13.2)	5 (10.6)	1.73 (0.54 - 5.59)	
AA	38 (52.1)	29 (61.7)	1.48 (0.70 - 3.13)	0.297	37 (48.7)	32 (68.1)		
AG+GG	35 (47.9)	18 (38.3)			39 (51.3)	15 (31.9)	2.25 (1.05 - 4.81)	<b>0.033</b>
AA+AG	65 (89.0)	42 (89.4)	1.03 (0.32 - 3.37)	0.956	66 (86.8)	42 (89.4)		0.675
GG	8 (11.0)	5 (10.6)			10 (13.2)	5 (10.6)	1.27 (0.41 - 3.98)	
AA+GG	46 (63.0)	34 (72.3)	1.54 (0.69 - 3.40)	0.287	47 (61.8)	37 (78.7)	2.28 (0.99 - 5.28)	<b>0.0467</b>
AG	27 (37.0)	13 (27.7)			29 (38.2)	10 (21.3)		
GG	8 (11.0)	5 (10.6)	1.22 (0.39 - 3.72)	>0.999 <sup>b</sup>	10 (13.2)	5 (10.6)	1.73 (0.53 - 4.96)	0.403 <sup>b</sup>
AA	38 (52.0)	29 (61.7)			37 (48.7)	32 (68.1)		
log-Aditivo	73	47	1.24 (0.72 - 2.16)	0.431	76	47	1.60 (0.92 - 2.79)	0.086
<b>IL4 rs2243250</b>	<i>n</i> = 75	<i>n</i> = 47			<i>n</i> = 76	<i>n</i> = 47		
CC	40 (53.3)	18 (38.3)			40 (52.6)	18 (38.3)		
TC	26 (34.7)	18 (38.3)	0.65 (0.29 - 1.47)	0.154	27 (35.5)	20 (42.6)	0.61 (0.27 - 1.36)	0.259
TT	9 (12.0)	11 (23.4)	0.37 (0.13 - 1.04)		9 (11.8)	9 (19.1)	0.45 (0.15 - 1.32)	
CC	40 (53.3)	18 (38.3)	0.54 (0.26 - 1.14)	0.104	40 (52.6)	18 (38.3)		0.120
TC+TT	35 (46.7)	29 (61.7)			36 (47.4)	29 (61.7)	0.56 (0.27 - 1.17)	
CC+TC	66 (88.0)	36 (76.6)	0.45 (0.17 - 1.18)	0.102	67 (88.2)	38 (80.9)		0.270
TT	9 (12.0)	11 (23.4)			9 (11.8)	9 (19.1)	0.57 (0.21 - 1.55)	
C	106 (70.7)	54 (57.4)	1.78 (1.04 - 3.04)	<b>0.038<sup>b</sup></b>	107 (70.4)	56 (59.6)	1.61 (0.94 - 2.74)	0.096 <sup>b</sup>
T	44 (29.3)	40 (42.6)			45 (29.6)	38 (40.4)		
CC	40 (53.3)	18 (38.3)	2.71 (1.01 - 7.79)	0.065 <sup>b</sup>	40 (52.6)	18 (38.3)		0.166 <sup>b</sup>
TT	9 (12.0)	11 (23.4)			9 (11.8)	9 (19.2)	2.22 (0.74 - 6.73)	
log-Aditivo	75	47	0.61 (0.37 - 1.01)	0.054	76	47	0.66 (0.39 - 1.09)	0.104
<b>CXCL8 rs4073</b>	<i>n</i> = 73	<i>n</i> = 47			<i>n</i> = 76	<i>n</i> = 47		
AA	28 (38.4)	16 (34.0)			29 (38.2)	11 (23.4)		
AT	32 (43.8)	23 (48.9)	0.80 (0.35 - 1.80)	0.853	28 (36.8)	27 (57.4)	0.39 (0.16 - 0.94)	0.075
TT	13 (17.8)	8 (17.0)	0.93 (0.32 - 2.72)		19 (25.0)	9 (19.1)	0.80 (0.28 - 2.30)	
AA	28 (38.4)	16 (34.0)	0.83 (0.39 - 1.78)	0.631	29 (38.2)	11 (23.4)	0.50 (0.22 - 1.12)	0.085
AT+TT	45 (61.6)	31 (66.0)			47 (61.8)	36 (76.6)		
AA+AT	60 (82.2)	39 (83.0)	1.06 (0.40 - 2.78)	0.911	57 (75.0)	38 (80.9)	1.41 (0.58 - 3.44)	0.448
TT	13 (17.8)	8 (17.0)			19 (25.0)	9 (19.1)		
AA+TT	41 (56.2)	24 (51.1)	0.81 (0.39 - 1.70)	0.584	48 (63.2)	20 (42.6)	0.43 (0.21 - 0.91)	<b>0.025</b>
AT	32 (43.8)	23 (48.9)			28 (36.8)	27 (57.4)		
log-Aditivo	73	47	0.93 (0.56 - 1.56)	0.790	76	47	0.85 (0.52 - 1.39)	0.515

<sup>a</sup>(%) número de indivíduos com o alelo ou genótipo especificado. Abreviaturas: M-MICRO, mulheres que deram à luz bebês com síndrome congênita do *Zika*; M-CT, mães que vivem em áreas endêmicas do *vírus Zika* que deram à luz bebês saudáveis; C-MICRO, crianças com síndrome congênita do *Zika*; C-CT, crianças saudáveis nascidas de mães residentes em áreas endêmicas do *vírus Zika*. Resultados de modelos de regressão logística univariada e teste exato de Fisher<sup>b</sup>; Negrito indica estatisticamente significativo

### 6.2.2 Associação entre as frequências alélicas do CXCL8 rs4073 e TRL7 rs179008 com a gravidade da microcefalia na síndrome congênita do *Zika*

Estratificando o grupo caso de crianças (C-MICRO) pela gravidade da microcefalia ao nascimento, em crianças com microcefalia grave (CMG) e crianças com microcefalia (CM), foi encontrada associação entre a presença do alelo T para o SNP rs4073 no gene CXCL8 no grupo de crianças com microcefalia grave em comparação ao grupo de crianças com microcefalia (Tabela 7, OR = 2.36; 95% IC = 1.00 – 5.51; p = 0.046).

A comparação das frequências alélicas para o SNP TRL7 rs179008 demonstrou que o alelo T é mais frequente no grupo CMG quando comparado com o grupo CM (Tabela 7, OR = 3.66; 95% IC = 1.06 – 12.2; p = 0.046).

Não foram encontradas diferenças significativas para os outros SNPs avaliados (Tabela 7).

**Tabela 7.** Associação entre as frequências alélicas do CXCL8 rs4073 e TLR7 rs179008 com a gravidade da microcefalia na síndrome congênita do *Zika*.

Gene/ SNP		Gravidade da microcefalia		Alelo	OR	IC 95%	p
		CMG (%) n = 42	CM (%) n = 18				
TREM1 rs2234246	C	39 (46.4)	15 (41.7)	C vs. T	1.21	0.54 - 2.59	0.691
	T	45 (53.6)	21 (58.3)				
CXCL10 rs4508917	A	58 (69.0)	25 (69.4)	A vs. G	0.98	0.43 - 2.18	>0.999
	G	26 (31.0)	11 (30.6)				
IL4 rs2243250	C	56 (66.7)	29 (80.6)	C vs. T	0.48	0.19 - 1.20	0.187
	T	28 (33.3)	7 (19.4)				
CXCL8 rs4073	T	40 (47.6)	10 (27.8)	T vs. A	2.36	1.00 - 5.51	<b>0.046</b>
	A	44 (52.4)	26 (72.2)				
TLR3 rs3775290	C	59 (70.2)	26 (72.2)	C vs. T	0.90	0.37 - 2.07	>0.999
	T	25 (29.8)	10 (27.8)				
TLR7 rs179008	T	21 (25.0)	3 (8.3)	T vs. A	3.66	1.06 - 12.2	<b>0.046</b>
	A	63 (75.0)	33 (91.7)				
IFNGR1 rs2234711	A	43 (51.2)	18 (50.0)	A vs. G	1.04	0.46 - 2.35	>0.999
	G	41 (48.8)	18 (50.0)				
CXCR1 rs2854386	C	74 (88.1)	33 (91.7)	C vs. G	0.67	0.18 - 2.60	0.752
	G	10 (11.9)	3 (8.3)				
IL10 rs1800871	A	34 (40.5)	17 (47.2)	A vs. G	0.76	0.33 - 1.73	0.548
	G	50 (59.5)	19 (52.8)				
IL10 rs1800872	T	34 (40.5)	17 (47.2)	T vs. C	0.76	0.33 - 1.73	0.548
	C	50 (59.5)	19 (52.8)				
IL10 rs1800896	T	38 (45.2)	17 (47.2)	T vs. C	0.92	0.41 - 2.09	0.844
	C	46 (54.8)	19 (52.8)				
CCR5 rs1800023	A	64 (76.2)	27 (75.0)	A vs. G	1.06	0.45 - 2.62	>0.999
	G	20 (23.8)	9 (25.0)				
CCR2 rs1799864	A	13 (15.5)	8 (22.2)	A vs. G	0.64	0.24 - 1.74	0.433
	G	71 (84.5)	28 (77.8)				
CCR5 rs1799987	A	40 (47.6)	22 (61.1)	A vs. G	0.57	0.26 - 1.28	0.231
	G	44 (52.4)	14 (38.9)				
CCR5 rs1800024	C	70 (83.3)	28 (77.8)	C vs. T	1.42	0.53 - 3.66	0.454
	T	14 (16.7)	8 (22.2)				
CCR5 rs1799988	C	41 (48.8)	22 (61.1)	C vs. T	0.60	0.27 - 1.35	0.237
	T	43 (51.2)	14 (38.9)				

(%) número dos sujeitos com o alelo especificado.

Abreviaturas: CMG, crianças com microcefalia grave por infecção congênita pelo *vírus Zika*; CM, crianças com microcefalia por infecção congênita por *vírus Zika*; OR, Odds ratio; IC 95%, 95% intervalo de confiança; p, teste Exato de Fisher.

## 7 DISCUSSÃO

Frente ao grave problema de saúde pública advindo das infecções por *vírus Zika*, a busca pelo entendimento dos fatores do hospedeiro que podem modular as infecções, interferindo em seu desfecho, são imprescindíveis, principalmente na SCZ, na qual os fatores patológicos ocorrem intraútero, quando é difícil ter acesso aos eventos imunológicos que ocorrem durante a agressão do SNC do concepto.

Neste estudo, foi encontrada associação entre o C no SNP TREM1 rs2234246 e alelo C no SNP IL4 rs224325 em mães infectadas por *vírus Zika* durante a gestação, com a ocorrência de microcefalia decorrente da SCZ em suas crianças, e do alelo G no SNP CXCL10 rs4508917 e do genótipo AA+TT no SNP CXCL8 rs4073 com presença de microcefalia por SCZ nas crianças. Ademais, os SNPs CXCL8 rs4073 e TRL7 rs179008 foram associados com a gravidade da microcefalia em crianças com SCZ.

### 7.1 Associação entre TREM1 rs2234246, CXCL10 rs4508917, IL4 rs224325 e CXCL8 rs4073 e a ocorrência da síndrome congênita do *Zika*

O receptor de ativação do tipo 1 expresso em células mieloides - do inglês *Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells 1* - (TREM-1) é um receptor de superfície celular que está presente em diferentes tipos de células humanas, sendo constitutivamente expresso em monócitos, neutrófilos, células dendríticas (DCs), células natural *killers* (NK) e outros linfócitos (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; BOUCHON; HERNÁNDEZ-MUNAIN; CELLA; et al., 2001; ALLCOCK; BARROW; FORBES; et al., 2003). A ativação do TREM-1 desempenha um papel fundamental na amplificação e regulação da resposta inflamatória na RI inata (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000) e tem sido estudada em diversas doenças, como as causadas por enterovírus, infecções bacteriana e parasitárias (SU; LIU; LI; et al., 2012; SHI; LI; HU; et al., 2013; BOMFIM; MAGALHÃES; SANTOS-FILHO; et al., 2017; LIU; ZHANG; ZHANG; et al., 2018).

Estudos sugerem que a via de sinalização do TREM-1 é ativada a partir da ligação deste com o seu ligante, o que leva a fosforilação da proteína adaptadora DAP12 e ativação dos fatores de transcrição NF- $\kappa$ B, culminando na expressão e regulação de genes pro-inflamatórios (BOUCHON; DIETRICH; COLONNA, 2000; BOUCHON; HERNÁNDEZ-MUNAIN; CELLA; et al., 2001). Além disso, outras vias de ativação, amplificando a resposta

a partir da ativação de outros receptores, como os receptores do tipo *Toll*, já foram sugeridas (BOUCHON; HERNÁNDEZ-MUNAIN; CELLA; et al., 2001)..

O gene TREM1 está localizado na banda 21 do braço curto do cromossomo 6 e o SNP rs2234246 no TREM1, caracterizado pela variação C>T, é localizado na região UTR3' e descrito como funcional, regulando os níveis de expressão do TREM1 (ALDASORO ARGUINANO; DADÉ; STATHOPOULOU; et al., 2017). O alelo T para esse SNP está associado a níveis mais elevados tanto de expressão gênica, quanto dos níveis plasmáticos da forma solúvel do TREM-1 (sTREM-1) em indivíduos saudáveis (ALDASORO ARGUINANO; DADÉ; STATHOPOULOU; et al., 2017). Contudo, a funcionalidade desse SNP na susceptibilidade à infecções e o seu papel em afetar os níveis de sTREM-1 durante a doença ativa ainda não é bem definido e parece variar de acordo com a população e doença investigada (SU; LIU; LI; et al., 2012; PENG; LI; ZHOU; et al., 2015; LIU; YAN; TAN; et al., 2020). O alelo T foi associado a susceptibilidade ao choque séptico e a maiores níveis de IL-6 no plasma quando comparado ao alelo C (PENG; LI; ZHOU; et al., 2015) e o genótipo TT foi associado à neuropatologia da doença de Alzheimer (LIU; YAN; TAN; et al., 2020). No entanto, a presença do alelo T foi associada à proteção contra a ocorrência de doença arterial coronariana (GOLOVKIN; PONASENKO; KHUTORNAYA; et al., 2014).

Classicamente, a indução robusta da RI inata na fase inicial das infecções virais constitui um ponto crítico para a eliminação dos vírus e a correta estimulação da RI adaptativa. Esse reconhecimento inicial depende da capacidade dos receptores de reconhecimento padrão (PRRs) reconhecerem patógenos virais, contudo, o balanço existente entre os extremos da resposta inflamatória é um ponto importante para evitar danos teciduais e prognósticos ruins (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). Os achados do presente estudo mostram a associação do alelo C para SNP rs2234246 no TREM1 como fator de risco para a SCZ, que é o desfecho mais grave advindo da infecção pelo *vírus Zika*, e do alelo T como protetor e associado ao grupo controle. Embora o papel do TREM-1 tenha sido pouco estudado em infecções virais até então, estudos demonstram aumento da expressão gênica do gene TREM1 durante infecções virais *in vitro*, sugerindo a ativação da sinalização do TREM-1 por vírus (MOHAMADZADEH; COBERLEY; OLINGER; et al., 2006; DENNER; ESCHRICHT; LAUCK; et al., 2013). Além disso, é sugerido que o TREM-1 consiga reconhecer padrões moleculares associados a patógenos virais, como o *Polyinosinic:polycytidylic acid* (Poly I:C), ligante do receptor TLR-3, receptor importante na patogênese causada pelo *vírus Zika* (DANG; TIWARI; LICHINCHI; et al., 2016), e que esse reconhecimento leve a produção de citocinas pro-inflamatórias importantes para a redução da

carga viral (BLEHARSKI; KIESSLER; BUONSANTI; et al., 2003; MOHAMADZADEH; COBERLEY; OLINGER; et al., 2006). Os dados apresentados aqui sugerem que esta variação genética no gene TREM1 em mulheres grávidas pode influenciar o risco de desenvolvimento de SCZ em seus bebês, indicando que uma menor expressão/ativação de TREM1 pode afetar o controle da infecção pelo *vírus Zika*, contribuindo para aumento da carga viral e indução de danos neurológicos no feto, que são fatores contributivos para a SCZ, o que reforça a necessidade de um melhor entendimento do papel do TREM-1 nesta patogênese.

Níveis mais elevados de sTREM-1 já foram descritos como indicativos de prognósticos ruins em estágios iniciais da infecção pelo arbovírus *Dengue* (RUIZ-PACHECO; VIVANCO-CID; IZAGUIRRE-HERNÁNDEZ; et al., 2014) e recentemente, nos desfechos das infecções pelo SARS-CoV-2 (DA SILVA-NETO; DE CARVALHO; PIMENTEL; et al., 2021). Como descrito anteriormente, níveis mais elevados de sTREM-1 foram associados à variante T para o SNP rs2234246 no TREM1, que neste estudo foi mais frequente no grupo controle e, logo, associada à proteção contra SCZ. A função da forma solúvel do TREM-1 ainda não é bem definida, porém é sugerido que esta molécula atue regulando negativamente a via de ativação do TREM-1 (GÓMEZ-PIÑA; SOARES-SCHANOSKI; RODRÍGUEZ-ROJAS; et al., 2007). Corroborando nesse sentido, e levando em conta os achados disponíveis na literatura, é possível que a presença do alelo T no grupo controle seja um indicativo de proteção via mecanismo para controlar dano tecidual, atenuando os sinais pro-inflamatórios via liberação do sTREM-1.

O SNP rs224325 no gene IL4 é localizado na região UTR5' do braço longo do cromossomo 5 e promove a troca de nucleotídeos C-T (-590C/T). Em ensaio com luciferase foi demonstrado que este SNP é funcional e que a variante alternativa T aumenta a atividade promotora de IL4 (ROSENWASSER; KLEMM; DRESBACK; et al., 1995), aumentando os níveis desta proteína (GONZALES; GRÖGER; HALEY; et al., 2010). A influência desse SNP no desfecho de doenças vem sendo estudada, com um destaque para avaliação do seu funcionamento na patogênese de neoplasias e ele já foi associado à susceptibilidade de diferentes tipos de câncer (JIA; XIE; SHI; et al., 2017; GONZALEZ-HORMAZABAL; RETAMALES-ORTEGA; MUSLEH; et al., 2020). Este SNP também é sugerido como um fator de suscetibilidade em parasitoses, a exemplo da esquistossomose, na qual já foi demonstrado que este SNP é essencial para regular a carga da doença, sendo genótipo TT associado com pior prognóstico (ADEDOKUN; SEAMANS; COX; et al., 2018).

No presente estudo, o alelo C para o IL4 rs224325 foi mais frequente e associado significativamente com mães que tiveram filhos com microcefalia decorrente da infecção pelo *vírus Zika*, o que, de acordo com a função descrita para esse SNP, pode estar associado a níveis mais baixos de IL-4 quando comparado com o alelo T. A IL-4 desempenha papel crucial para polarização e montagem de RI do tipo Th2. É possível que essa variação gênica ajude a promover um desequilíbrio entre as RI Th1 e Th2, e que a menor expressão de IL4 prejudique o reparo tecidual, favorecendo o aumento da inflamação exacerbada e danos na placenta, contribuindo para a ocorrência da SCZ. Além disso, apesar de não estatisticamente significativa, o alelo C para este SNP também foi mais frequente no grupo de crianças com microcefalia, o que corrobora a hipótese acima. Estudo recente demonstrou que dano tecidual na placenta é induzido pelo *vírus Zika* (RABELO; DE SOUZA; SALOMÃO; et al., 2020). Por outro lado, níveis mais altos de IL-4 durante a fase aguda da infecção pelo *vírus Zika* foram relacionados à uma mãe que gestava criança com malformações neurológica, quando comparado com 5 mães que gestavam crianças normais (KAM; LEITE; LUM; et al., 2017). Além disso, foi demonstrado que a presença de IL-4 pode retardar a diminuição da carga viral e desempenhar um papel prejudicial contra a infecção em modelo murino de infecção por influenza (MORAN; ISOBE; FERNANDEZ-SESMA; et al., 1996).

Vinhaes, Arriaga, Almeida et al. (2020), avaliando níveis plasmáticos de citocinas em neonatos com e sem microcefalia mostraram que, como esperado, o grupo de crianças com infecção pelo *vírus Zika* têm níveis mais altos de expressão de citocinas quando comparado com o controle, o que foi caracterizado pelos autores como um aumento do grau molecular sistêmico de perturbação inflamatória (VINHAES; ARRIAGA; DE ALMEIDA; et al., 2020). Nesse sentido, diversos estudos demonstram uma tempestade de citocinas associado às crianças com SCZ. No entanto, são escassos os estudos que avaliam fatores genéticos nesta condição.

No presente estudo, foi encontrada associação entre a presença de pelo menos um alelo G para o SNP rs4508917 no gene CXCL10 e a microcefalia. Este SNP está localizado no cromossomo 4 e promove uma variação do A>G, estando o alelo G correlacionado ao aumento da expressão da quimiocina de mesmo nome, também conhecida como IP-10 (JAFARZADEH; FOOLADSERESHT; NEMATI; et al., 2016). Naveca, Pontes, Chang, et al. (2018) apontam a CXCL10 como o mais promissor biomarcador para a infecção aguda por *Zika* devido a sua superexpressão (NAVECA; PONTES; CHANG; et al., 2018). Em concordância com estes resultados, a superexpressão de CXCL-10 tem sido ligada à sinalização da via dos interferons do tipo 2 (IFN-2) IFN $\gamma$ , induzida pelo vírus, embora o *vírus*

*Zika* suprime a via IFN-1 e IFN-3 como mecanismo de evasão (CHAUDHARY; YUEN; CHAN; et al., 2017). Logo, a maior frequência do alelo G nas crianças com microcefalia, sugere que o *background* genético das crianças pode influenciar no fenótipo de alta expressão desta quimiocina. Além disso, é possível que a maior frequência do alelo alto produtor nas crianças com microcefalia por SCZ contribua para o dano neurológico, afetando o desenvolvimento do SNC do feto durante a gestação, uma vez que esta quimiocina já foi associada a outras complicações de ordem neurológica (LIU; GUO; HIBBERT; et al., 2011; CHIANG; UBOGU, 2013). Esta hipótese coaduna com os altos níveis de CXCL-10 encontrados em crianças com malformações congênitas nascidas de mães infectadas com o vírus *Zika* durante a gestação, quando comparadas com aquelas nascidas normais, mas de mães também *Zika* positivo durante a gestação (KAM; LEITE; LUM; et al., 2017). De maneira complementar, este mesmo trabalho também observou níveis mais elevados de CXCL-10 em pacientes infectados com o vírus *Zika* que desenvolveram complicações neurológicas (KAM; LEITE; LUM; et al., 2017).

O gene CXCL8 está localizado no braço longo do cromossomo 4 e codifica a proteína de mesmo nome, também conhecida como IL-8, que é apontada como a mais potente quimiocina já descrita, participando de maneira crucial de diversos processos inflamatórios desencadeados pela RI inata e adaptativa (REMICK, 2005; ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). O SNP rs4073 (-251A>T) é localizado na região promotora do gene e relacionado a variações na expressão gênica e níveis da quimiocina CXCL-8, sendo o alelo A relacionado a níveis mais altos de CXCL-8 (HULL; THOMSON; KWIATKOWSKI, 2000; OHYAUCHI; IMATANI; YONECHI; et al., 2005). Por conta do papel crítico que esta citocina desempenha, este SNP vem sendo associado à diferentes doenças como neoplasias (KAMALI-SARVESTANI; ALIPARASTI; ATEFI, 2007; CHEN; HO; HU; et al., 2020; LI; YANG; HSIA; et al., 2022), periodontite (ANDIA; DE OLIVEIRA; LETRA; et al., 2011), sepse em neonatos (ESPOSITO; ZAMPIERO; PUGNI; et al., 2014), infecções por vírus sincicial respiratório (NOAH; HENDERSON; WORTMAN; et al., 1995; HULL; THOMSON; KWIATKOWSKI, 2000). Aqui, genótipo AA/TT para o SNP rs4073 no gene CXCL8 foi mais frequente no grupo de crianças com SCZ, quando este foi comparado com o grupo de crianças controle, enquanto o genótipo heterozigoto AT foi mais frequente no grupo de crianças controle.

## 7.2 Associação entre as frequências alélicas do CXCL8 rs4073 e TLR7 rs179008 com a gravidade da microcefalia na síndrome congênita do Zika

A fim de avaliar se os SNP utilizados neste estudo estavam associados à gravidade da microcefalia advinda da SCZ, o grupo de crianças caso foi estratificado. Esta análise revelou frequências significativamente diferentes no SNP rs4073 no gene CXCL8, e o rs179008 no gene TLR7 entre os grupos, associando estes SNPs à gravidade da microcefalia.

O receptor endossomal TLR-7 reconhece RNA de fita simples e desempenha papel importante no reconhecimento de patógenos virais por meio da ativação da RI inata para produção de IFN do tipo 1 (ABBAS; LICHTMAN; PILLAI, 2015). O SNP rs179008 (A>T) é uma variação intragênica e promove a troca de glutamina pela leucina, afetando a quantidade e a funcionalidade da proteína, sendo o alelo T ligado à menor expressão de TLR7 e a menor expressão de IFN $\lambda$  (AZAR; MEJÍA; CENAC; et al., 2020). Essa variante tem sido associada à infecções virais, sendo ligada à diferentes prognósticos ((ASKAR; RAMADORI; MIHM, 2010; AZAR; MEJÍA; CENAC; et al., 2020; SÁNCHEZ-LUQUEZ; SCHADOCK; GONÇALVES; et al., 2021; SENGUPTA; MUKHERJEE; BHATTACHARYA; et al., 2021; MINASHKIN; GRIGORTSEVICH; KAMAEVA; et al., 2022).

Neste ínterim, atendo-se à funcionalidade desses SNPs e às funções desempenhadas por estas proteínas, a associação do alelo T no CXCL8 rs4073 e do alelo T no TLR7 rs179008 com a gravidade da microcefalia sugere o envolvimento da resposta inflamatória resolutiva atenuada, prejudicando a defesa antiviral, em concordância com o achado prévio do grupo (SANTOS; RIBEIRO; CARDOSO ALVES; et al., 2019). Em conformidade com esta hipótese, a presença do genótipo TT para este SNP no gene TLR7 foi previamente associada com a susceptibilidade a infecção pelo vírus Herpes simplex -1 e ao aumento do risco de infecções na placenta (SÁNCHEZ-LUQUEZ; SCHADOCK; GONÇALVES; et al., 2021). Ainda, níveis mais altos de CXCL-8 no líquido cefalorraquidiano foram encontrados em neonatos sem SCZ que nasceram de mães infectadas com o *vírus Zika* durante a gestação, quando comparados com àqueles nascidos com microcefalia pela SCZ, sugerindo um papel importante desta quimiocina na proteção contra SCZ (NASCIMENTO-CARVALHO; NASCIMENTO-CARVALHO; RAMOS; et al., 2021). Sendo assim, é possível que a defesa antiviral menor no feto predisponha à invasão do SNC pelo *vírus Zika* e possa ser um agravante do quadro neurológico desencadeado pela infecção congênita por *vírus Zika*.

Apesar de serem genes envolvidos na RI a infecções virais e implicados na susceptibilidade à infecções, não foram encontradas diferenças nas frequências genotípicas e

alélicas entre os grupos que compuseram a população deste estudo, nos SNPs nos genes TLR3, IFNGR1, CXCR1, IL-10, CCR2 e CCR5, para nenhuma das análises realizadas. Esse fato não afasta que haja influência destes SNPs na patogênese desencadeada pelo *vírus Zika*, pois, a não associação pode ter ocorrido devido ao número limitado de indivíduos incluídos nas análises, afetando o poder do estudo. Além disso, é importante ressaltar que os SNPs CXCL10 rs4508917 e TLR7 rs179008 não mostraram equilíbrio no teste EHW no grupo controle. O desequilíbrio pode ser devido tanto ao tamanho amostral como ao viés de seleção da população estudada, pois foram selecionadas apenas mães das mesmas regiões onde ocorreram os casos de SCZ e que estiveram gestantes no mesmo período do surto de *Zika*, a maioria de regiões do interior do estado de Sergipe. Apesar de serem limitações do presente estudo, estes fatores citados acima também colocam em destaque as associações encontradas aqui, visto que se trata de uma análise envolvendo uma doença que ocorre com uma frequência baixa na população geral e que os indivíduos inclusos, tanto no grupo caso quanto no grupo controle são representativos deste total.

Quanto às características clínico-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 pelo *vírus Zika* (BRASIL; PEREIRA; MOREIRA; et al., 2016b; OSPINA; TONG; GONZALEZ; et al., 2020; PACHECO; BELTRÁN; NELSON; et al., 2020). Além disso, outra observação importante diz respeito à presença de IgG para *Dengue* em quase todas as mães que compuseram o grupo caso do presente estudo (90.67% - Tabela 1). Cabe frisar que a alta incidência e prevalência de dengue no Brasil e em Sergipe antecedem o surto de *Zika*, por isso é mais provável que a exposição da mãe ao vírus *Dengue* tenha acontecido antes da SCZ (SERGIPE, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020; PAHO; WHO, 2022). Além disso, segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (2022), a incidência de *Dengue* se manteve elevada mesmo durante o surto do *vírus Zika* no Brasil (PAHO; WHO, 2022). Esses dados relacionados à sorologia já foram publicados em artigo do grupo (REYNOLDS; WATBER; SANTOS; et al., 2020) e sugerem que a microcefalia pode ocorrer em crianças nascidas de mães com imunidade sorológica prévia à *Dengue*, quando estas são infectadas pelo *vírus Zika* durante a gestação.

Juntos, 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 TREM1, IL4, CXCL10, CXCL8 e

TLR7 como genes promissores para futuros estudos funcionais, para melhor entendimento dos seus respectivos papéis na imunopatogênese da infecção congênita pelo *vírus Zika*.

## 8 CONCLUSÕES

A partir do presente estudo pode-se concluir que:

- A presença de sintomas nas mães durante a infecção pelo *vírus Zika* foi associado à ocorrência da SCZ nessa população;
- A presença do alelo C no SNP rs2234246 no gene TREM1 e no SNP rs2243250 no gene IL4 em mães infectadas pelo *vírus Zika* durante a gestação está associada ao desfecho de SCZ nos bebês nesta população;
- A presença do alelo C no SNP rs2234246 no gene TREM1, alelo G no SNP rs4508917 no gene CXCL10 e do genótipo AA/TT no SNP CXCL8 rs4073 nas crianças que nasceram de mães infectadas pelo *vírus Zika* ou que tiveram contato com o vírus durante a gestação está associada com a SCZ, nessa população;
- A presença do alelo T no SNP rs4073 no gene CXCL8 e rs179008 no gene TLR7 nas crianças com microcefalia está associada com microcefalia grave, nesta população.

**CAPÍTULO II - *Avaliação in vitro do fenótipo da resposta imune dos linfócitos T de pacientes com recorrência da COVID-19***

## 9 SARS-CoV-2

O SARS-CoV-2 foi isolado pela primeira vez no final de dezembro de 2019, na cidade de Wuhan, China, a partir de pacientes que apresentavam quadros característicos de pneumonia viral, causada por um patógeno até então não identificado (ZHU; ZHANG; WANG; et al., 2020). Mais tarde, o novo coronavírus SARS-CoV-2 foi identificado e a doença causada por ele foi determinada como COVID-19 (GORBALENYA; BAKER; BARIC; et al., 2020).

Estudos de análise filogenética mostraram que o SARS-CoV-2 é consideravelmente divergente dos vírus SARS-CoV e MERS-CoV e sugerem que os morcegos podem ter sido os hospedeiros originais, uma vez que o coronavírus encontrado nesses animais e o SARS-CoV-2 compartilham cerca de 88% de similaridade genética (ELLINGHAUS; DEGENHARDT; BUJANDA; et al., 2020; LU; ZHAO; LI; et al., 2020).

Como membro da família Coronaviridae, o SARS-CoV-2 possui um genoma constituído de RNA de fita simples e sentido positivo. O SARS-CoV-2 é um  $\beta$ coronavírus que possui genoma com aproximadamente 30 mil pares de bases que codificam cerca de 29 proteínas, sendo quatro proteínas estruturais: Spike (S), relacionada à ligação do vírus ao hospedeiro; Envelope (E), proteína que desempenha papel importante na produção e maturação viral; Membrana (M), proteína mais abundante e envolvida na definição da forma do envelope viral e Nucleocapsídeo (N), proteína envolvida na produção, maturação e formação da partícula viral infectiva (LU; ZHAO; LI; et al., 2020; WANG; ZHANG; WU; et al., 2020).

### 9.1 Aspectos epidemiológicos e clínicos das infecções por SARS-CoV-2

Devido ao seu caráter de fácil disseminação e presença endêmica na maior parte dos países do globo, foi decretado pela Organização Mundial da Saúde, no começo do ano de 2020, o estado de pandemia, modificando completamente diversos aspectos sociais e econômicos em todo o mundo (CHEN; VULLIKANTI; SANTOS; et al., 2021; KAYE; OKEAGU; PHAM; et al., 2021; LYTRAS; TSIODRAS, 2021; VARONA; GONZALES, 2021).

Ao longo da pandemia, são incontáveis os esforços internacionais para o controle da doença, que já atingiu mais de 650 milhões de pessoas em todo o mundo e levou a óbito mais de 6,6 milhões de pessoas (WHO, 2022b). No Brasil, os casos chegaram aos alarmantes

números de mais de 36 milhões de casos e 690 mil mortes confirmados, o que confere ao Brasil o posto de país com o quinto maior número de mortes por COVID-19 no mundo (WHO, 2022b).

O SARS-CoV-2 é transmitido principalmente de maneira horizontal, por meio de gotículas respiratórias contendo partículas virais provenientes de uma pessoa infectada. Contudo, outras vias de transmissão menos comuns, como por aerossóis, fômites e por contato com outras amostras biológicas, como fezes e urina também têm sido relatadas (CHIA; COLEMAN; TAN; et al., 2020; DING; LIANG, 2020; THE LANCET RESPIRATORY MEDICINE, 2020; MONDELLI; COLANERI; SEMINARI; et al., 2021). Ademais, pessoas assintomáticas são capazes de transmitir o vírus, o que as coloca como uma importante fonte de infecção (JOHANSSON; QUANDELACY; KADA; et al., 2021).

O período médio de incubação pode variar de acordo com a variante do vírus, mas é de cerca de 4 a 5 dias antes do início dos sintomas. A COVID-19 tem um largo espectro de apresentações clínicas. A maioria das pessoas infectadas podem apresentar sintomas leves ou moderados, sendo os principais sintomas febre, tosse seca, fadiga, perda de paladar e olfato e cefaleia. Em contrapartida, algumas pessoas podem ser assintomáticas. Aproximadamente 20% das pessoas infectadas apresentam quadros graves da doença e necessitam de hospitalização, geralmente com quadros de pneumonia, evoluindo, entre outros casos, à síndrome respiratória aguda grave (CHEN; ZHOU; DONG; et al., 2020; ZHU; ZHANG; WANG; et al., 2020; WHO, 2022a; ZEISER; DONIDA; DA COSTA; et al., 2022). Além disso, alguns sintomas, como confusão mental, anosmia e disgeusia podem ser persistentes em algumas pessoas que tiveram COVID-19, porém o porquê disso ocorrer ainda é incerto e discutido na literatura (NOUJAIM; JOLLY; COUTUREAU; et al., 2022).

A rápida e desregrada disseminação mundial do SARS-CoV-2 permitiu a adaptação do vírus a diferentes ambientes propiciando a ocorrência de várias mutações em seu genoma inicial e o surgimento de novas variantes do vírus. Embora, até o momento, a maioria das mutações surgidas no genoma do SARS-CoV-2 seja neutra ou de baixo impacto, as Variantes de Preocupação (VP), que são variantes que possuem um pequeno número de mutações que podem afetar o fenótipo do vírus e conferir vantagens evolutivas a estes (AKKIZ, 2022), foram relatadas em diferentes partes do globo. As VP causam impacto na transmissibilidade, infectividade ou gravidade da doença causada, afetando o risco de reinfecção e a potência dos anticorpos neutralizantes desencadeados por infecção e vacinação anteriores e, por estes motivos, o acompanhamento do surgimento de VP do SARS-CoV-2 por meio de epidemiologia molecular, constituem ponto crucial na vigilância epidemiológica na atualidade

(GUO; LIU; ZHENG, 2021; HEMMER; LÖBERMANN; REISINGER, 2021; NAVECA; NASCIMENTO; DE SOUZA; et al., 2021; TANG; TAMBYAH; HUI, 2021; TEGALLY; WILKINSON; GIOVANETTI; et al., 2021; AKKIZ, 2022).

Diferentes VP mostraram-se relevantes para o curso da pandemia em regiões distintas do mundo. No Brasil, estudo do nosso grupo mostrou a ocorrência de desfechos mais graves de COVID-19 em pessoas infectadas com as VP (Gamma/P.1 e P.2), quando comparado com pessoas que tiveram COVID-19 antes do aparecimento destas variantes (VICTOR; SANTOS; TORRES; et al., 2022). Também foram variantes importantes no Brasil e no mundo as chamadas variantes Alpha, Beta e Delta, responsáveis por aumento considerável no número de casos e internações pela COVID-19 (WHO, 2022c). No último ano, a VP que merece destaque é a B.1.1.529, conhecida como Omicron (WHO, 2022c). Com um número de mutações maior do que as variantes anteriores, a Omicron parece ser mais transmissível e está se espalhando mais rapidamente do que qualquer variante anterior do SARS-CoV-2. As mutações no genoma da Omicron ocorrem principalmente na proteína Spike, importante da ligação do vírus com as células humanas. Dados preliminares sugerem que esta característica faz com que as vacinas preexistentes contra o SARS-CoV-2 sejam menos eficazes contra a variante Omicron, assim como a imunidade natural obtida por meio de doença, possibilitando o escape desta variante das defesas do sistema imunológico, aumentando o risco de reinfecção. Subvariantes da Omicron também já foram reportadas. Ainda não está claro se a Omicron causa doença mais grave do que as variantes anteriores, contudo, estudos preliminares sugerem que a Omicron possa causar sintomas menos graves do que as outras variantes (REN; WANG; GAO; et al., 2022; WHO, 2022c).

Como explicitado anteriormente, apesar da disponibilização de vacinas que contribuíram para uma redução acentuada nos casos de COVID-19, novas ondas de pessoas acometidas pela doença elevou o alerta para a capacidade de controle do vírus (ALEEM; AKBAR SAMAD; SLENKER, 2022). Além disso, há relatos de casos de pacientes com recorrência da COVID-19, ou seja, múltiplos quadros da doença, com reaparecimento de sinais e sintomas e positividade do diagnóstico molecular em cada episódio da doença (SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021; SOTOODEH GHORBANI; TAHERPOUR; BAYAT; et al., 2022).

### 9.1.1 Recorrência da COVID-19

Há incertezas em relação à imunidade a longo prazo após a infecção por SARS-CoV-2. De maneira geral, a literatura tem demonstrado que a recorrência, que pode ser entendida como o reaparecimento de sinais e sintomas da COVID-19 após um período sem sintomas depois de um primeiro episódio da doença, e pode ser desencadeada tanto por uma nova infecção, seja por uma forma variante do vírus ou não, como também por um quadro de reativação viral após um período de latência (YAHAV; YELIN; ECKERLE; et al., 2021; SOTOODEH GHORBANI; TAHERPOUR; BAYAT; et al., 2022).

Ghorbani e colaboradores (2022) mostram que a estimativa combinada de reinfecção, recorrência e readmissão hospitalar entre pacientes com COVID-19 recuperados foi de 3, 133 e 75 por 1.000 pacientes, respectivamente, com uma estimativa geral de reinfecção maior entre as pessoas do sexo masculino. Além disso, apesar de a maioria dos casos estar relacionado com o ressurgimento de doença leve, o estudo aponta a probabilidade de readmissão hospitalar devido a eventos adversos da COVID-19 após a alta, o que pode ser considerado um fator preocupante relacionado a estes episódios (SOTOODEH GHORBANI; TAHERPOUR; BAYAT; et al., 2022). Artigo posterior publicado pelo nosso grupo também relatou piora relativa dos sinais e sintomas em pacientes com recorrência da COVID-19 (SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021). Contudo, outros estudos sugerem que a gravidade do segundo episódio de infecção por SARS-CoV-2 é igual à do primeiro episódio (NGUYEN; HOUHAMDI; HOANG; et al., 2022) e que a taxa geral de reinfecção por SARS-CoV-2 é baixa (NORDSTRÖM; BALLIN; NORDSTRÖM, 2022), o que corrobora com a ideia de que alguma imunodeficiência pode estar modulando a resposta à infecção nos casos de recorrência. Interessantemente, Nguyen e colaboradores (2022) mostram que a reinfecção pode ocorrer mesmo em pacientes com anticorpos circulantes contra SARS-CoV-2 (NGUYEN; HOUHAMDI; HOANG; et al., 2022).

Nesse ínterim, a atual conjectura demonstra a necessidade de melhor compreensão desses casos de recorrência, a fim de superar as dificuldades impostas por ele ao sistema de saúde e à população geral.

## 9.2 Aspectos imunológicos associados às infecções por SARS-CoV-2

Mesmo com um grande esforço da comunidade científica, os mecanismos responsáveis pela RI desenvolvida durante a infecção por SARS-CoV-2 ainda não estão

inteiramente esclarecidos (CHEN; ZHOU; DONG; et al., 2020; LAKE, 2020; ZHANG; XIANG; HUO; et al., 2021). Pessoas com problemas médicos subjacentes, como diabetes, obesidade, neoplasias, doenças cardiovasculares, doenças respiratórias crônicas e idosos, podem apresentar complicações mais graves quando infectados (LI; GUAN; WU; et al., 2020). Contudo, variações dos quadros de doença que contribuem para o agravamento dos casos em pessoas previamente saudáveis ou episódios de recorrência da doença citados anteriormente são alguns dos pontos que ressaltam o quão pouco é sabido acerca da imunopatogênese da COVID-19.

A infecção por SARS-CoV-2 nas células pulmonares desencadeiam uma RI inata local, recrutando macrófagos e monócitos que respondem à infecção, liberam citocinas e iniciam as RI adaptativas de linfócitos T e B. Na maior parte dos casos, esse processo é capaz de resolver a infecção. Porém, uma RI disfuncional, marcada por alto influxo de células e tempestade de citocinas, que promovem um extenso processo inflamatório, pode acontecer em alguns casos e causar graves lesões pulmonares e sistêmicas (TAY; POH; RÉNIA; et al., 2020).

Alguns biomarcadores da resposta imune já foram descritos como característicos da infecção por SARS-CoV-2 a partir de análises de soro de pacientes acometidos. Entre eles, IL-6, PCR, IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP-10, MCP-1, MIP-1A, TREM-1 e TNF- $\alpha$  foram encontradas em altos níveis nos soros de pacientes que necessitaram internamento em unidade de tratamento intensivo (UTI), quando comparados com pacientes que não necessitaram (HUANG; WANG; LI; et al., 2020; MUDD; CRAWFORD; TURNER; et al., 2020; DE BRUIN; BOS; VAN ROON; et al., 2021). Na avaliação da expressão gênica no fluido bronco alveolar e células mononucleares do sangue periférico, transcritos de mRNA dos genes IP10, MCP1, MIP1A e MIP1B foram significativamente mais expressos em pacientes com COVID-19, quando comparados com controles (XIONG; LIU; CAO; et al., 2020).

Estudos avaliando os estágios iniciais seguidos da infecção pelo SARS-CoV-2 demonstram que as respostas mediadas por IFN-1 e pelos genes induzidos por IFN são suprimidas, prejudicando assim a RI inata e minimizando a ativação dos eventos da RI adaptativa (ALAVI DARAZAM; SHOKOUHI; POURHOSEINGHOLI; et al., 2021). Além disso, foi demonstrado que o número total de células NK diminui acentuadamente em pacientes com infecção por SARS-CoV-2 e que essas células passam a expressar mais marcadores de exaustão em pacientes com COVID-19, em comparação com controles saudáveis. O mesmo estudo mostrou ainda que o número total de células NK e TCD8<sup>+</sup> foram reestabelecidos em pacientes convalescentes, assim como houve a redução da expressão de

marcadores de exaustão nessas células (ZHENG; GAO; WANG; et al., 2020), o que sugere evasão do SARS-CoV-2 à RI antiviral.

Em relação à RI adaptativa, a literatura mostra que a infecção por SARS-CoV-2 é marcada por leucopenia, com diminuição gradual dos linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> proporcional à gravidade da COVID-19, com um aumento de marcadores de ativação nestas células de pacientes com COVID-19 grave, quando comparados com pacientes com sintomatologia leve (QIN; ZHOU; HU; et al., 2020; WANG; HOU; LUO; et al., 2020), o que sugere inconsistência no número e função dos linfócitos entre os desfechos causados pela infecção por SARS-CoV-2. Além disso, pacientes com COVID-19 grave também mostraram diminuição de células dendríticas e linfócitos B ativados (WANG; HOU; LUO; et al., 2020), além de níveis mais baixos de células T reguladoras e células T de memória (QIN; ZHOU; HU; et al., 2020).

A indução de anticorpos frente à infecção por SARS-CoV-2 também já foi avaliada. Xiao, Gao e Zhang, et al. (2020) mostraram que anticorpos específicos para SARS-CoV-2 foram encontrados a partir de duas semanas após o início dos sintomas e permaneceram até a quarta semana. Após cinco semanas, alguns pacientes não apresentaram mais IgM, enquanto os níveis de IgG continuaram a subir e estavam presente até o fim do estudo, sete semanas, após o início dos sintomas (XIAO; GAO; ZHANG, 2020). A Reação cruzada entre anticorpos preexistentes para outros coronavírus humanos e o SARS-CoV-2 também já foi observada (DEMEY; DAHER; FRANÇOIS; et al., 2020).

O SARS-CoV-2 tem demonstrado uma grande capacidade de apresentar VP, como explicitado anteriormente, com mudanças importantes em estruturas essenciais a infecção viral (YEWDELL, 2021), possibilitando escape do sistema imune e os episódios de reinfeção. Somado a isso, fatores do organismo hospedeiro desempenham um papel fundamental na permissibilidade ou capacidade de controle da infecção pelo SARS-CoV-2 e desenvolvimento da COVID-19 e são sugeridos como um ponto importante para o entendimento dos quadros de recorrência da doença (ANASTASSOPOULOU; GKIZARIOTI; PATRINOS; et al., 2020).

Compreender melhor a RI do organismo hospedeiro em relação à infecção pelo vírus SARS-CoV-2 e elucidar o porquê algumas pessoas desenvolvem quadros recorrentes da COVID-19 é imprescindível, principalmente com as novas ondas de casos da doença e aumento no número de mortes. Nesse intuito, artigo publicado pelo nosso grupo recrutou e estudou de maneira preliminar 33 pacientes com recorrência da COVID-19. Todos eles apresentaram dois ou mais quadros sintomáticos de COVID-19 e tiveram diagnóstico

molecular positivo em cada um dos episódios de doença, antes do surgimento de VPs ser reportado no Brasil. Esses pacientes apresentaram uma produção significativamente menor de anticorpos IgG específicos quando comparados a pacientes com apenas um caso da doença. Além disso, houve uma piora relativa dos sinais e sintomas (SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021), o que sugere que os pacientes com recorrência de COVID-19 apresentam alguma alteração na resposta imune que facilita a recorrência da doença, entretanto, os mecanismos envolvidos nesse processo de permanecem sem esclarecimento, explicitando o quão imperativa é a realização de estudos que possibilitem melhor entendimento acerca deste tema.

## 10 OBJETIVOS

### 10.1 Geral

Caracterizar a resposta imune celular de pacientes com quadros de recorrência da COVID-19.

- *Hipótese: Variações no perfil dos linfócitos T estão associados à quadros de recorrência de casos clínicos das infecções por SARS -CoV-2.*

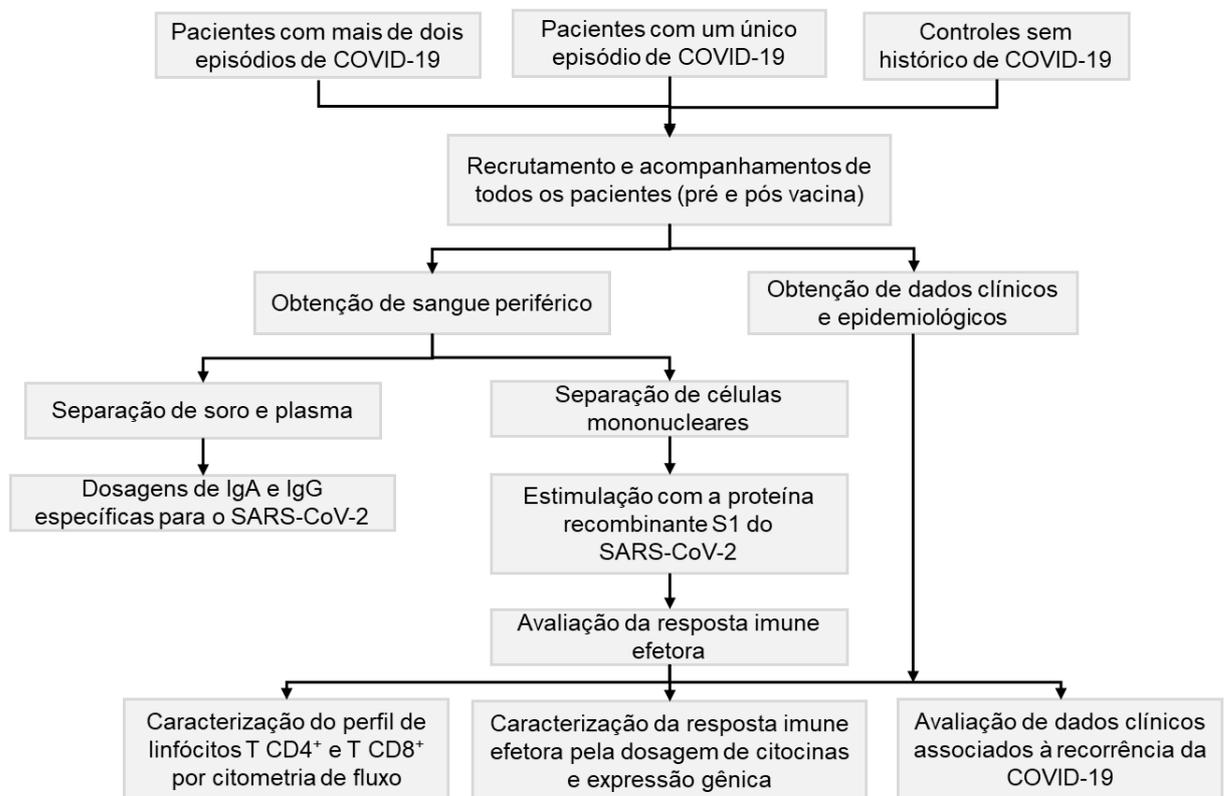
### 10.2 Específicos

1. Avaliar aspectos epidemiológicos e clínicos associados à recorrência da COVID-19;
2. Avaliar a resposta celular de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> multifuncionais entre grupos de pacientes com e sem recorrência de COVID-19;
3. Avaliar a resposta celular de linfócitos TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> multifuncionais à vacinação para SARS-CoV-2 entre grupos de pacientes com e sem recorrência de COVID-19.

## 11 MATERIAIS E MÉTODOS

### 11.1 Delineamento do estudo e desenho experimental

Trata-se de estudo de série de casos com grupo controle e as metodologias utilizadas para a elucidação dos objetivos estão agrupadas de acordo com o desenho experimental exposto abaixo.



### 11.2 Aspectos éticos

Este estudo foi desenvolvido no Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular da Universidade Federal de Sergipe (LIBM/HU-UFS) e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFS (Parecer: 4.018.577). O estudo especificado neste Capítulo II faz parte da colaboração direta do LIBM/HU-UFS com o Prof. Dr. João Santana da Silva, da Plataforma Bi-institucional Fiocruz/FMRP-USP. Essa colaboração direta se dá por meio de um projeto maior intitulado *“Vacina contra Covid-19 usando vírus da influenza recombinante*

*expressando fragmentos do spike do SARSCoV-2: efeito sobre comorbidades pulmonares e resposta imune de pacientes curados da doença”* aprovado pela CAPES (Edital 11/2020, Programa Estratégico Emergencial de Prevenção e Combate a Surtos, Endemias, Epidemias e Pandemias) e liderado pelo Prof. Dr. João Santana da Silva.

### **11.3 População estudada**

O estudo inclui indivíduos que se apresentaram por demanda espontânea nos ambulatórios de infectologia, clínica médica ou de outros serviços do HU-UFS e foram recrutados por apresentar quadros de recorrência da COVID-19 ou um único episódio da doença. Controles que não apresentaram qualquer histórico da doença foram recrutados por meio de busca ativa. Todos os pacientes participantes do projeto foram selecionados nos serviços HU-UFS.

A definição dos três grupos de estudo se deu da seguinte forma:

- Grupo com Recorrência da COVID-19 (COV- Rec):
  - Pacientes com dois ou mais quadros clínicos recorrentes de COVID-19 após quarentena de 15 dias, recuperação clínica completa do quadro anterior e com um mínimo de 30 dias após voltar às suas atividades normais entre episódios de COVID-19. Os episódios de recorrência foram acompanhados de positividade no diagnóstico molecular e retorno de sintomatologia clínica em todos os episódios. Todos os pacientes tiveram episódios de recorrência entre abril de 2020 a dezembro de 2020, quando as VP ainda não estavam circulando no estado de Sergipe (DOS SANTOS; BEZERRA; DE AZEVEDO MARINHO; et al., 2021).
- Grupo com um COVID-19 Único (COV-Uni)
  - Pacientes com quadro clínico único de COVID-19 com positividade para o teste molecular. Todos os pacientes foram diagnosticados no período de agosto de 2020 a março de 2021.
- Grupo Controle (CT)
  - Indivíduos com ausência de histórico da doença.

Além da separação em três diferentes grupos, todos os pacientes foram convidados a fornecer amostras biológicas e informações clínico-epidemiológicas antes da vacinação contra SARS-CoV-2 e após a segunda dose da vacinação.

### 11.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Todos os indivíduos maiores de 18 anos e os seus pais ou responsáveis dos menores de 18 anos assinaram TCLE (APÊNDICE C), 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 deles é voluntária. A infecção por SARS-CoV-2, ou ausência dela, foi confirmada através da técnica de RT-qPCR. Os pacientes que se recusaram a participar da pesquisa, pacientes que receberam tratamentos com imunossupressores e pacientes com comorbidades que afetem a resposta imune (incluindo infecção por HIV e malignidade) foram excluídos da pesquisa.

### 11.4 Coleta de informações clínico-epidemiológicas

Informações clínico-epidemiológicas foram coletadas por meio de entrevista semiestruturada a partir de questionário aplicado pelos pesquisadores responsáveis pelo estudo (APÊNDICE D). Alguns dados complementares também foram obtidos através de busca ativa em prontuários disponíveis no HU-UFS.

### 11.5 Coleta de material biológico

Todas as amostras biológicas dos indivíduos participantes do estudo foram previamente colhidas, processadas e armazenadas no LIBM/HU-UFS até o momento da análise. As amostras de todos os grupos de indivíduos participantes do estudo foram colhidas nos momentos pré-vacinação e pelo menos 30 dias e no máximo 60 dias após segunda dose de vacinação contra COVID-19. O recrutamento de todos os indivíduos inclusos no estudo e a coleta de amostras biológicas destes foi realizado durante o período de fevereiro a dezembro de 2021.

#### 11.5.1 Obtenção de soro e plasma

Por meio de venipuntura, 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. As amostras obtidas serão estocadas a -80 °C até o uso.

### 11.5.2 Obtenção e cultura de células mononucleares do sangue periférico (PBMC)

Por meio de venipuntura, foi coletado 20 mL de sangue total em tubo contendo heparina. O sangue foi diluído na proporção 1:1 com solução salina e submetido a um gradiente de densidade com o uso de Histopaque®-1077, segundo instruções do fabricante (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), por meio de centrifugação (Eppendorf 5810r, EUA) a 400x g, por 35 min, a uma temperatura de 24 °C, conforme protocolo previamente padronizado pelo grupo (MAGALHÃES; MELO; DAMASCENA; et al., 2022). Após a centrifugação, foi visualizada a nuvem formada por células mononucleares, que foram coletadas com o auxílio de pipetador automático e então lavadas duas vezes com solução salina, a 300x g e a 400x g, por 10 minutos a 24°C, com ressuspensão das células entre as lavagens. Em seguida, as células foram contadas em câmara Neubauer (Boeco, Hamburgo, Alemanha) e posteriormente ressuspensas em meio de cultura RPMI 1640 (Gibco, Carsbad, CA, USA) suplementado com 10% de Soro Bovino Fetal inativado (iSBF) e 1% de antibiótico penicilina e estreptomicina (Pen/Strep). As células foram então plaqueadas em placa de 48 poços, na quantidade de  $1 \times 10^6$  células por poço e incubadas em estufa a 37°C com 5% de CO<sub>2</sub>.

## 11.6 Ensaios relacionados aos Objetivos Específicos

### 11.6.1 Caracterização da resposta de linfócitos por citometria de fluxo

O protocolo de citometria se baseia em técnica previamente publicada e padronizada pelo grupo (SANTOS; NICO; DE OLIVEIRA; et al., 2017; BEZERRA-SANTOS; DO VALE-SIMON; BARRETO; et al., 2018). De maneira breve, as células mononucleares do sangue periférico foram estimuladas com o antígeno S1, da proteína *Spike* do SARS-CoV-2, cedidas pelo Prof. Dr. Ricardo Tostes Gazinelli da UFMG/Fiocruz Ribeirão Preto. Para comparação das respostas produzidas, as células também foram estimuladas com o mitógeno fitohemaglutinina (PHA) ou não foram estimuladas. Após o período de incubação com o estímulo, essas células foram marcadas com anticorpos monoclonais anti-humanos de superfície e intracelulares conjugados a fluorocromos. Basicamente, as células foram tratadas com solução de bloqueio (2% de soro bovino fetal + 2% de soro caprino fetal diluídos em PBS 1X), para evitar ligações de imunoglobulinas inespecíficas, e incubadas na ausência de luz por 30 min a 4 °C. Em seguida, as células foram lavadas e incubadas com anticorpos

monoclonais para marcação das moléculas de superfície específicas (30 min à 4 °C). Para marcação intracelular, após incubação, as células foram lavadas duas vezes com o tampão PBS e foi adicionado 100 µL do tampão de permeabilização Cytofix / Cytoperm (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA, EUA). Após 20 min de permeabilização, as células foram incubadas por 30 min a 4 °C com mix de marcação intracelular. Para verificar a ativação multifuncional de linfócitos T foram usados os marcadores de superfície celular CD3 PE-Cy7 , CD4 V500, CD8 PE.Cy5 e os marcadores intracelulares IL-2 BV421, IFN- $\gamma$  Alexa Fluor-488 e TNF- $\alpha$  APC. Em seguida, as células foram lavadas com o tampão PermWash (BD Biosciences Pharmingen, San Diego, CA), ressuspendidas em 350 µL de PBS. Ao final do processo, as células foram transferidas para um tubo de acrílico e então adquiridas no citômetro de fluxo com a aquisição de 100.000 eventos (na região de linfócitos) para cada uma das condições do estudo. Foi utilizado o citômetro de fluxo BD FASCanto II (BD Biosciences, USA) utilizando o Software Diva 6.0. A compensação dos fluorocromos dos anticorpos, bem como a análise e caracterização do perfil fenotípico das células adquiridas foi realizada utilizando a análise booleana do Software FlowJo versão 10.0 (BD Biosciences, USA).

#### 11.6.2 Dosagens de IgG e IgA específicos para SARS-CoV-2

Para avaliar a presença de Imunoglobulinas específicas IgG e IgA contra o SARS-CoV-2, o soro de todos os pacientes foi testado por meio de ensaios de imunoabsorção enzimática (ELISA) específicos para a fração S (spike) – IgG e IgA, e N (nucleocapsídeo) - IgG do SARS-CoV-2. Os ensaios foram realizados pelo uso de kits da Euroimmun (PerkinElmer, Alemanha), de acordo com as orientações dos fabricantes, descrita no item 5.5.6.1.

#### 11.6.3 Dosagem de citocinas

Em paralelo ao descrito anteriormente, as células mononucleares foram estimuladas nas mesmas condições, mas por um tempo total de 72h. Ao final desse tempo, foram obtidos sobrenadantes das culturas estimuladas e as células foram armazenadas em conservante de mRNA (descrito no próximo item).

Os sobrenadantes das culturas foram utilizados para dosagem de citocinas e quimiocinas a partir de ensaios multiplex. As dosagens multiplex foram realizadas de acordo com as recomendações do fabricante e foram utilizados kits MILLIPLEX MAP Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel (Merck KGaA, Alemanha), com os seguintes alvos: IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ , IFN- $\alpha$ 2, IL-6, IL-8, IL-4, IP-10, MCP-1 e TGF $\alpha$ . As dosagens foram feitas em um Luminex100/200, utilizando o Software XMAP e Merck Analyst.

#### 11.6.4 Análise estatística

Os resultados obtidos foram avaliados através do software GraphPad Prism 5 e R Studio. A análise de normalidade foi feita pelo teste de D'Agostino-Pearson. As diferenças entre grupos foram avaliadas utilizando o teste de Mann-Whitney e as diferenças entre condições de um mesmo grupo, por meio do teste de Wilcoxon. O teste Exato de Fisher foi utilizado para testar a associação de características clínicas e epidemiológicas. As correlações foram feitas por meio do teste de Spearman e a clusterização de fenótipos correlatos foram realizadas por meio da análise de componente principal, ambos utilizando o pacote *corrplot* do R. Os padrões de fenótipos de células T foram comparados por permutação parcial não paramétrica usando o software SPICE (ROEDERER; NOZZI; NASON, 2011). Os dados foram considerados estatisticamente significantes com valores de  $p \leq 0,05$ .

## 12 RESULTADOS

### 12.1 Características clínico-epidemiológicas

As características dos pacientes incluídos no Capítulo II deste estudo são mostradas na Tabela 8. Seguindo os critérios estabelecidos no item 11.3, foram incluídos um total de 18 indivíduos no grupo de pacientes com COVID-19 recorrente (COV-Rec), e 29 indivíduos nos grupos controles, sendo 15 controles com apenas um episódio de COVID-19 (COV-Uni) e 14 controles sem relatos infecção por SARS-CoV-2 (CT). As médias das idades para os grupos COV-Rec, COV-Uni e CT foram de 40.5, 30.2 e 35.5, respectivamente (Tabela 8,  $p = 0.346$ ). Os pacientes do grupo COV-Rec foram, em sua maioria, do sexo feminino  $n = 17$  (94.44%), quando comparados com os grupos controle (Tabela 8,  $p = 0.016$ ). Mais pacientes que compuseram o grupo COV-Rec tinham comorbidades (Tabela 8,  $p = 0.016$ ) e buscaram atendimento na unidade de urgência durante a ocorrência da COVID-19 (Tabela 8,  $p = 0.007$ ), quando comparados aos pacientes do grupo COV-Uni. Além disso, o grupo COV-Rec foi totalmente composto por profissionais de saúde, enquanto parte dos pacientes dos grupos controles exercem outras profissões (Tabela 8,  $p = 0.007$ ). Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos quanto à presença de sintomatologia, apesar de 100% dos participantes que tiveram recorrência da COVID-19 serem sintomáticos (Tabela 8,  $p = 0.076$ ). O tipo sanguíneo mais frequente entre os grupos de pacientes foi o tipo O, seguido do tipo A, contudo, não houve diferença significativa entre os grupos nesse quesito (Tabela 8,  $p = >0.999$ ). Quanto à vacina recebida contra a COVID-19, a maior parte dos participantes dos grupos incluídos neste estudo recebeu o imunizante CoronaVac.

**Tabela 8** Informações clínico-epidemiológicas dos indivíduos com recorrência de COVID-19 e grupos controle.

Variáveis	Recorrência COV	Controle COV	Controle	p
	COV-Rec (n = 18)	COV-Uni (n = 15)	CT (n = 14)	
Total	(n = 18)	(n = 15)	(n = 14)	
Idade (média ± DP)	40.5 ± 9	30.2 ± 13.2	35.5 ± 12.5	0.346 <sup>a</sup>
Sexo (%)				
Feminino	17 (94.44)	6 (40)	12 (85.7)	
Masculino	1 (5.56)	9 (60)	2 (14.3)	<b>0.016<sup>b</sup></b>
Tipo sanguíneo*				
A	5/15	5/12	2/11	
B	3/15	1/12	2/11	
AB	0	0	1/11	>0.999 <sup>b</sup>
O	7/15	6/12	6/11	
Ocorrência de sintomas				
Assintomático	0	3	N/A	
Sintomático	19	12	N/A	0.076
Atendimento em unidade de urgência*				
Sim	10/15	2	N/A	
Não	5/15	13	N/A	<b>0.007</b>
Doenças associadas**				
Sim	8 (44.44)	3 (20)	2/13 (15.39)	
Não	10 (55.56)	12 (80)	11/13 (84.61)	<b>0.016<sup>b</sup></b>
Atividade profissional				
Profissional de saúde	18 (100)	9 (60)	10 (71.43)	
Outras <sup>#</sup>	0	6 (40)	4 (28.57)	<b>0.007<sup>b</sup></b>
Vacina recebida				
CoronaVac	15 (83.33)	6/14 (42.86)	11/13 (84.6)	
Astrazeneca	3 (16.67)	6/14 (42.86)	1/13 (7.7)	-
Pfizer	0	2/14 (14.28)	1/13 (7.7)	

As variáveis quantitativas são apresentadas como valor médio e desvio padrão. \*Não foi possível obter a informação de todos os pacientes ou eles não souberam informar. <sup>a</sup>Kruskal-Wallis; <sup>b</sup>Teste exato de Fisher para a comparação entre COV-Rec vs COV-Uni + CT; \*\* Doenças associadas descritas foram obesidade, hipertensão arterial sistêmica, diabetes e hipotireoidismo. Profissional de saúde foram enfermeiros, biomédicos, médicos e farmacêuticos. Sintomatologia relatada pelos pacientes com um único episódio de COVID-19 foram: febre, tosse, coriza, dor na garganta, dispneia, diarreia, náusea/vômito, ageusia, anosmia, cefaleia e astenia. Sintomatologia relatada pelos pacientes recorrentes incluíram todos os sintomas relatados anteriormente, mais comprometimento pulmonar. <sup>#</sup>Outras áreas profissionais descritas foram educação (professor e aluno), advocacia, administração, estética e tecnologia da informação. Negrito indica diferenças estatisticamente significante.

## 12.2 Detecção de anticorpos contra SARS-CoV-2 em pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 e controles, antes e após a vacinação.

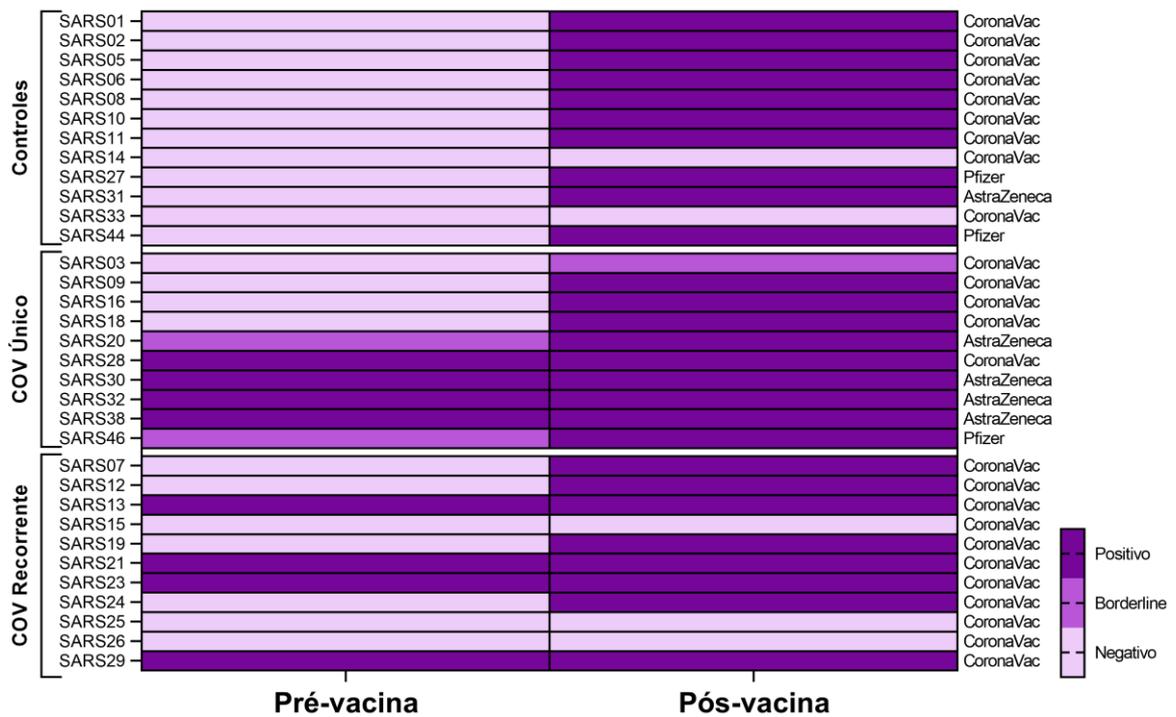
A fim de avaliar possíveis diferenças na produção/detecção de anticorpos entre os grupos incluídos neste estudo após ou não episódios de COVID-19, ensaios para detecção sorológica de IgG (S1 e N) e IgA (S1) foram realizados. Não foram encontradas diferenças significativas entre os grupos, tanto antes quanto após a vacinação (dados não mostrados). Apesar de não significativo, foi possível visualizar uma proporção menor de pacientes positivos para anticorpos IgG (S1 e N) e uma frequência maior de pacientes positivos para IgA (S1) no grupo de pacientes com recorrência (COV-Rec), quando comparado com pacientes que só tiveram um quadro de COVID-19 (COV-Uni), no período pré-vacina (Tabela 9). Após a vacinação, o total de pacientes positivos para os diferentes tipos de imunoglobulinas pesquisadas aumentou quando comparado ao período pré-vacinação, com uma frequência maior de pacientes positivos para IgG da proteína S1 em todos os grupos (Tabela 9). Foram identificadas diferenças significativas na quantidade de pacientes positivos em todos os grupos, quando cada grupo foi comparado entre si nos períodos pré e pós-vacina, para IgG (S1) e no grupo controle sem doença para IgA (S1) (Tabela 9). Adicionalmente, o perfil de detecção individual de anticorpos do tipo IgG anti-S1 para o SARS-CoV-2 nos os grupos de pacientes avaliados nesse estudo é demonstrada na Figura 1.

**Tabela 9** Presença de anticorpos contra SARS-CoV-2 antes e após vacinação.

Grupos	PRÉ-VACINA		PÓS-VACINA		OR	IC (95%)	p
	Negativo	Positivo	Negativo	Positivo			
<b>IgA S1 SARS-CoV-2</b>							
COV-Rec	7 (53.85)	6 (46.15)	8 (50)	8 (50)	1.167	0.28 – 4.97	>0.999
COV-Uni	7 (70)	3 (30)	5 (35.71)	9 (64.29)	4.200	0.71 - 19.14	0.213
CT	12 (93.3)	1 (7.69)	6 (50)	6 (50)	12.00	1.11 - 146.8	<b>0.030</b>
<b>IgG S1 SARS-CoV-2</b>							
COV-Rec	9 (69.23)	4 (30.77)	2 (12.50)	14 (87.50)	15.75	2.48 - 84.46	<b>0.002</b>
COV-Uni	5 (50)	5 (50)	0	14 (100)	-	-	<b>0.005</b>
CT	13 (100)	0	2 (14.29)	12 (85.71)	-	-	<b>&lt;0.0001</b>
<b>IgG NCP SARS-CoV-2</b>							
COV-Rec	9 (75)	3 (25)	6 (42.86)	8 (57.14)	4.00	0.77 - 17.50	0.130
COV-Uni	6 (54.55)	5 (45.55)	9 (69.23)	4 (30.77)	0.53	0.11 - 2.75	0.675
CT	13 (100)	0	11 (78.57)	3 (21.43)	-	-	0.222

Números totais de participantes dos quais foi possível obter amostra biológica. Detecção de anticorpos realizada pela técnica de ELISA. p = Teste exato de Fisher. Negrito indica diferenças estatisticamente significante.

**Figura 1** Perfil de detecção de IgG anti-S1 em pacientes com história da COVID-19 e controles.

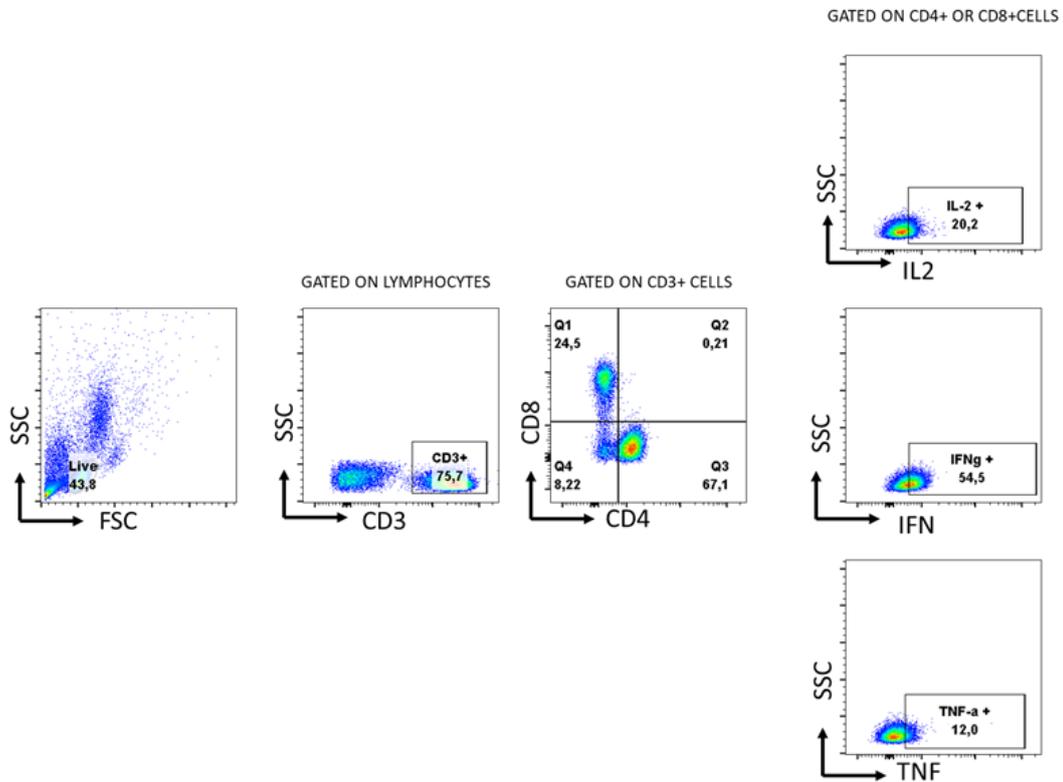


A figura apresenta um mapa da dosagem de IgG anti-S1 no soro de pacientes com COVID-19 para os três grupos incluídos no estudo: pacientes Controle (n =12), pacientes COV Único (n =11) e pacientes COV Recorrente (n =11), antes (Pré) e após (Pós) a vacinação dos pacientes. Os resultados são expressos em gradiente de cor de acordo com a classificação da dosagem obtida por ELISA e recomendada pelo fabricante: negativo, borderline e positivo. Adicionalmente, a vacina administrada em cada um dos pacientes é observada no lado direito do mapa.

### 12.3 Avaliação de células T multifuncionais em pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 e grupos controles antes e após a vacinação

A caracterização dos linfócitos T de pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 foi feita com a avaliação das células T multifuncionais clássicas após a estimulação com a proteína S1 do SARS-CoV-2. O fenótipo multifuncional clássico foi determinado como células T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> positivas para as citocinas IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  (Figura 2, resumo do esquema de *gates* da citometria).

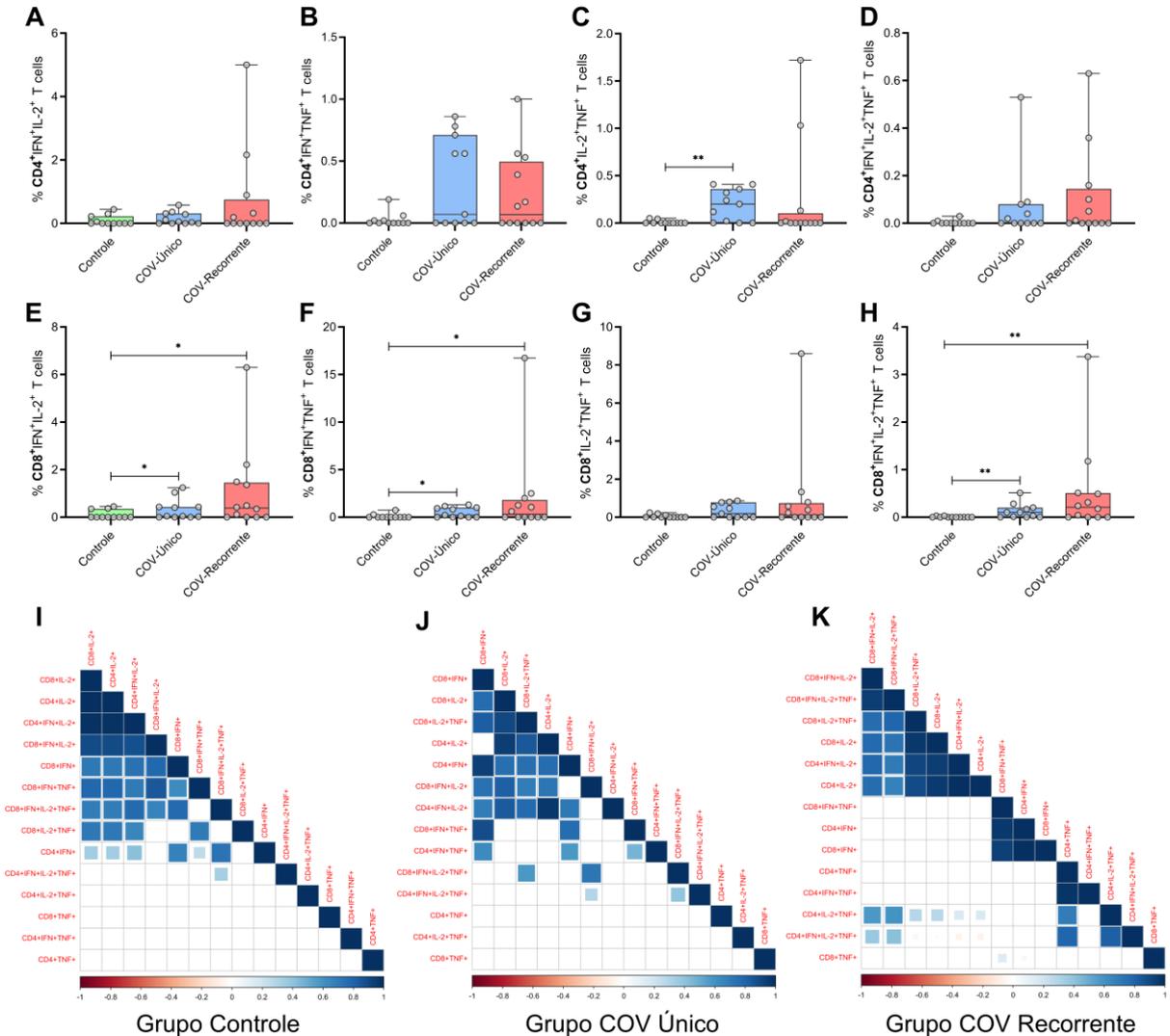
**Figura 2** Painel ilustrativo representando os parâmetros usados na citometria de fluxo para obtenção dos perfis funcionais de células TCD4<sup>+</sup> e TCD8<sup>+</sup> produzindo IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$ .



A frequência total de células expressando o fenótipo da citocina foi determinada em PBMC do grupo de pacientes com recorrência da COVID-19 e controles antes e após a vacinação contra SARS-CoV-2, estimulados com o antígeno do SARS-CoV-2 (S1).

Como demonstrado na Figura 3, não houve diferenças significativas na proporção de fenótipos de células T multifuncionais entre os grupos COV-Uni e COV-Rec. Entretanto, é possível observar que ambos os grupos tiveram uma maior proporção de células T CD8<sup>+</sup> dupla-positivas (CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) e triplas-positivas (CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) quando comparados ao grupo Controle (Figura 3 E, F e H). De maneira complementar, os padrões de resposta entre os grupos foram avaliados pela correlação entre fenótipos de células T e o seu agrupamento em um componente principal (Figura 3 I, J e K). É possível observar correlações positivas fortes em todos os três grupos avaliados para os mais variados fenótipos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.

**Figura 3** Avaliação do fenótipo de linfócitos T multifuncionais em pacientes com ou sem histórico de COVID-19 antes da vacinação.

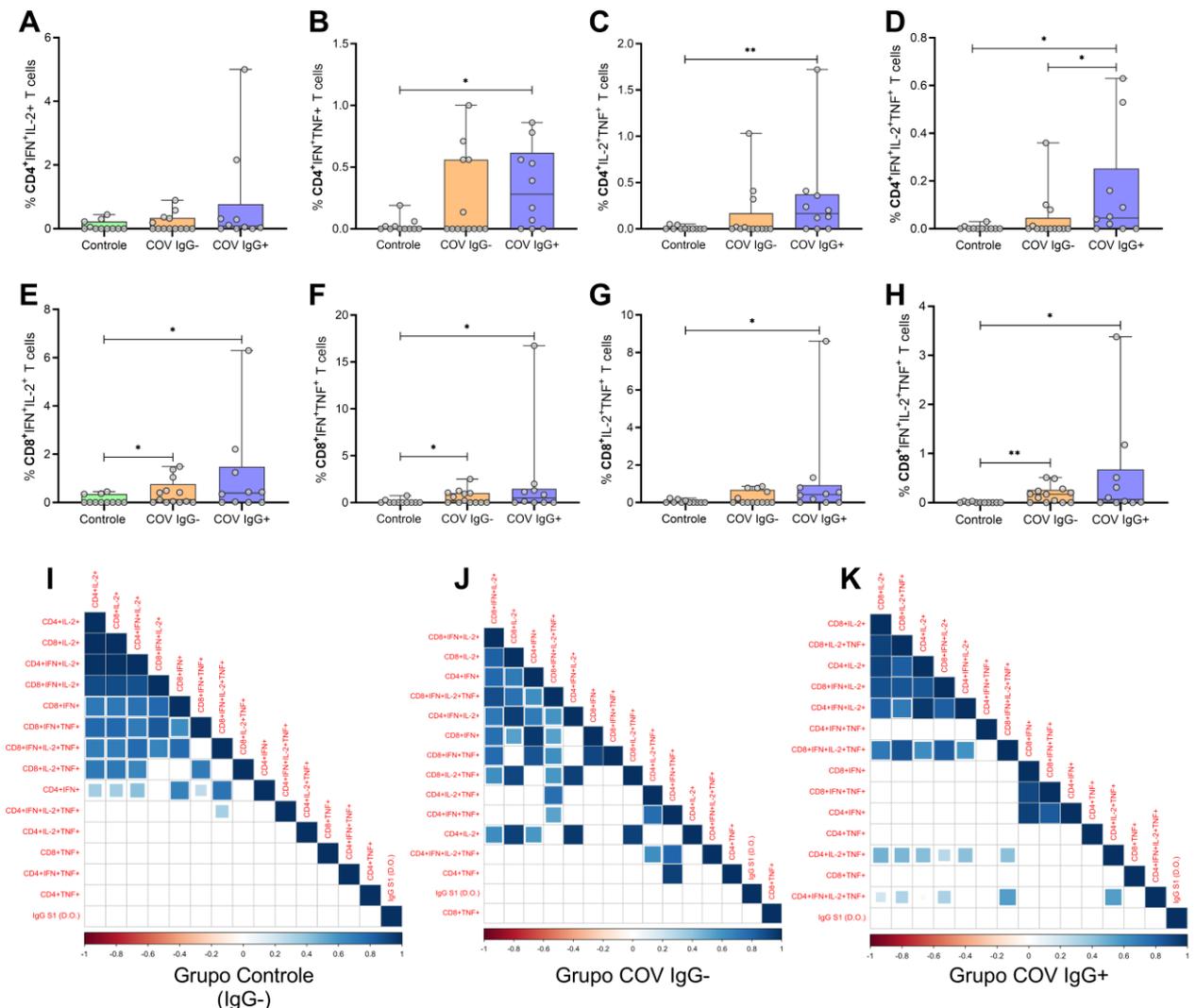


A porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi avaliada para expressão de duas ou três citocinas: CD4+IFN+IL-2+ (A), CD4+IFN+TNF+ (B), CD4+IL-2+TNF+ (C) e CD4+IFN+IL-2+TNF+ (D) para os grupos Controle, COV Único e COV Recorrente e após estimulação com a proteína S1. A mesma avaliação foi realizada para linfócitos T CD8<sup>+</sup>, ou seja: CD8+IFN+IL-2+ (E), CD8+IFN+TNF+ (F), CD8+IL-2+TNF+ (G), CD8+IFN+IL-2+TNF+ (H). Complementarmente, foram feitas correlações entre os valores de células expressando uma, duas ou três citocinas para cada um dos grupos avaliados, Controle (I), COV Único (J) e COV Recorrente (K) e, além disso, os fenótipos celulares foram agrupados de acordo com o primeiro componente principal. Os gráficos (A-H) apresentam boxplots com a média  $\pm$  valores mínimos e máximos após a subtração dos valores do meio não estimulado para cada grupo analisado, e os pontos representam os valores individuais de cada paciente (Controle, n = 11; COV Único, n = 11; COV Recorrente, n = 12). A diferenças foram avaliadas aos pares com o teste de Mann-Whitney. Os heatmaps (I-K) foram construídos utilizando correlações de Spearman, sendo em azul as correlações positivas e em vermelhos as correlações negativas para correlações significativas, enquanto os espaços em branco demonstram ausência de correlação significativa. Os fenótipos foram agrupados de acordo com o primeiro componente principal. A significância adotada em todos os testes foi  $p < 0,05$  (\*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ ).

Baseado nos dados anteriormente publicados sobre a recorrência da COVID-19, os fenótipos de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foram avaliadas para pacientes com história da COVID-

19 positivos ou negativos para IgG anti-S1, independente de história de recorrência. Como apresentado na Figura 4, os pacientes IgG+ tiveram uma maior produção de células T  $CD4^+IFN-\gamma^+IL-2^+TNF-\alpha^+$  quando comparados ao grupo Controle e ao grupo COV IgG- (Figura 4 D). Já o fenótipo triplo-positivo de célula T  $CD8^+$  foi mais presente em ambos os grupos quando comparados ao Controle (Figura 4 H). Além disso, pacientes COV IgG+ apresentaram mais células T duplas positivas tanto em  $CD4^+$  quanto em  $CD8^+$  (Figura 4 B, C, E, F e G) quando comparados ao Controle. Já o grupo COV IgG- apresentou mais células duplas para fenótipos de células T  $CD8^+$  (Figura 4 E e F). Adicionalmente, é possível observar um agrupamento heterogêneo de correlações nos grupos avaliados. Não foram observadas correlações significativas entre a densidade óptica das dosagens de IgG anti-S1 e os fenótipos de linfócitos T (Figura 4 I, J e K).

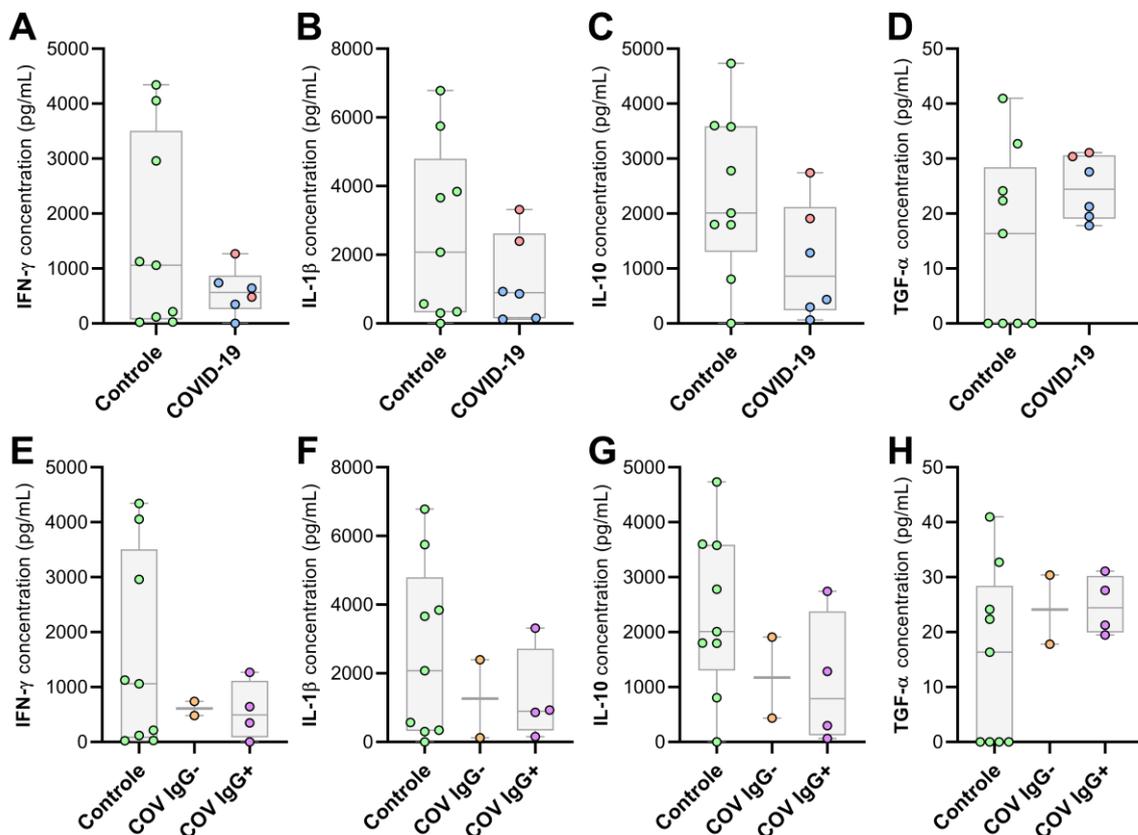
**Figura 4** Avaliação do fenótipo de linfócitos T multifuncionais em pacientes com ou sem histórico de COVID-19 de acordo com a produção de IgG anti-S1 antes da vacinação.



A porcentagem de linfócitos T CD4<sup>+</sup> foi avaliada para expressão de duas ou três citocinas: CD4+IFN+IL-2<sup>+</sup> (A), CD4+IFN+TNF<sup>+</sup> (B), CD4+IL-2+TNF<sup>+</sup> (C) e CD4+IFN+IL-2+TNF<sup>+</sup> (D) para os grupos Controle, COV IgG<sup>-</sup> e COV IgG<sup>+</sup> e após estimulação com a proteína S1. A mesma avaliação foi realizada para linfócitos T CD8<sup>+</sup>, ou seja: CD8+IFN+IL-2<sup>+</sup> (E), CD8+IFN+TNF<sup>+</sup> (F), CD8+IL-2+TNF<sup>+</sup> (G), CD8+IFN+IL-2+TNF<sup>+</sup> (H). Complementarmente, foram feitas correlações entre os valores de células expressando uma, duas ou três citocinas para cada um dos grupos avaliados, Controle (I), COV IgG<sup>-</sup> (J) e COV IgG<sup>+</sup> (K) e, além disso, os fenótipos celulares foram agrupados de acordo com o primeiro componente principal. Os gráficos (A-H) apresentam boxplots com a média  $\pm$  valores mínimos e máximos após a subtração dos valores do meio não estimulado para cada grupo analisado, e os pontos representam os valores individuais de cada paciente (Controle, n = 11; COV IgG<sup>-</sup>, n = 13; COV IgG<sup>+</sup>, n = 10). A diferenças foram avaliadas aos pares com o teste de Mann-Whitney. Os heatmaps (I-K) foram construídos utilizando correlações de Spearman, sendo em azul as correlações positivas e em vermelhos as correlações negativas para correlações significativas, enquanto os espaços em branco demonstram ausência de correlação significativa. Os fenótipos foram agrupados de acordo com o primeiro componente principal. A significância adotada em todos os testes foi  $p < 0,05$  (\*  $< 0,05$ , \*\*  $< 0,01$ ).

De forma adicional, a produção de citocinas pelas células mononucleares estimuladas com S1 foi avaliada nos diferentes grupos. É possível observar que não há diferenças significativas quando comparados os grupos COVID-19 e Controle ou COV IgG<sup>-</sup> e COV IgG<sup>+</sup> com o grupo Controle, tanto para IFN- $\gamma$  (Figura 5 A e E), IL-1 $\beta$  (Figura 5 B e F), IL-10 (Figura 5 C e G), e TGF- $\alpha$  (Figura 5 D e H), apesar de ser possível observar uma produção maior no grupo controle, na maioria dos analitos avaliados.

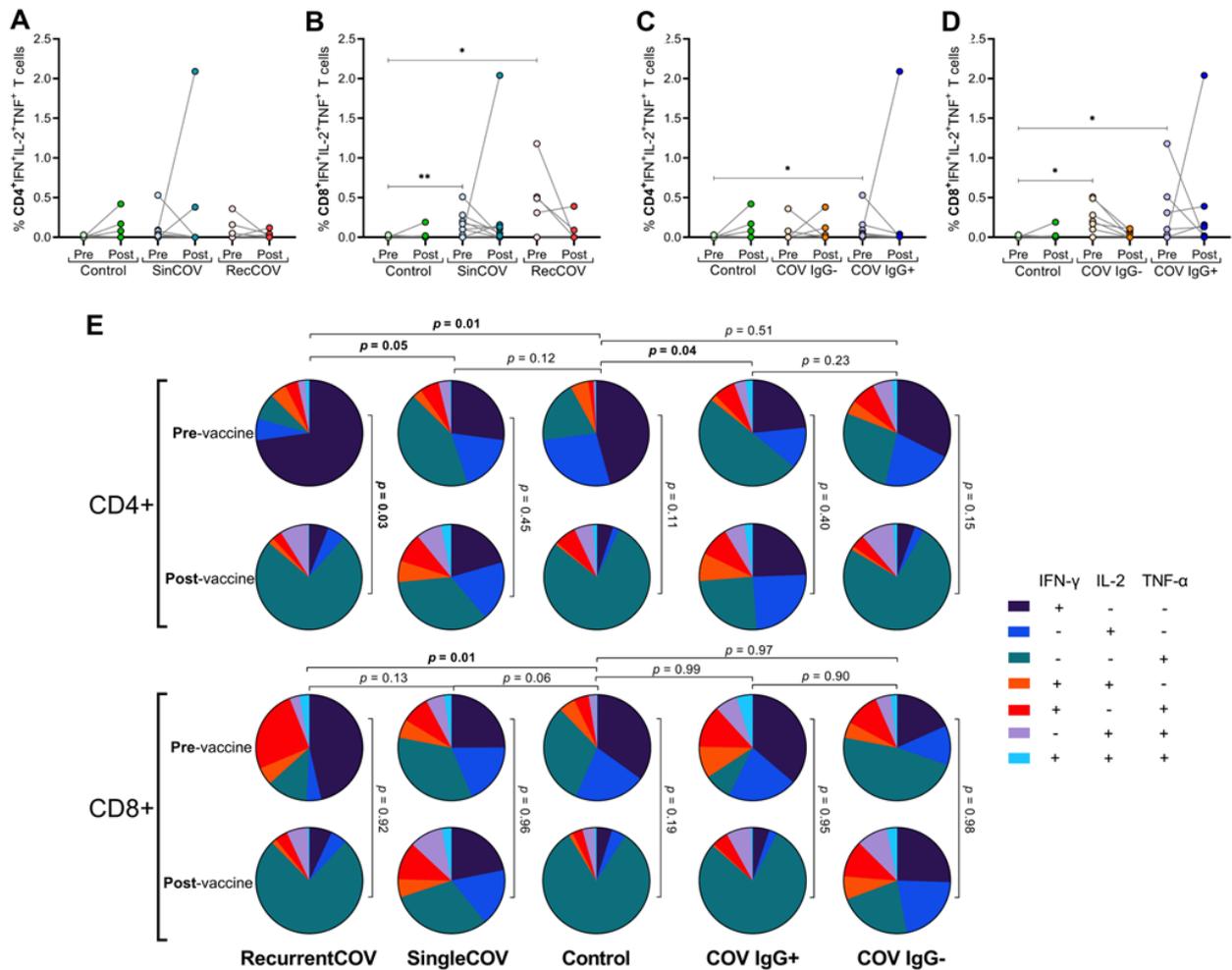
**Figura 5** Dosagem de citocinas no sobrenadante de cultura de células estimuladas com S1 antes da vacinação



Os gráficos representam a quantificação de citocinas no sobrenadante obtido de células mononucleares estimuladas com a proteína S1 por 72h para pacientes do grupo Controle (n = 9) e com história de COVID-19 (n = 6). O grupo COVID-19 se origina da união dos grupos COV Único e COV Recorrente (apresentados com cores diferentes). Adicionalmente são demonstrados os grupos Controle, COV IgG- e COV IgG+. As citocinas apresentadas são: IFN- $\gamma$  (A e E), IL-1 $\beta$  (B e F), IL-10 (C e G) e TGF- $\alpha$  (D e H). Os gráficos representam boxplots com a média  $\pm$  valores mínimos e máximos após a subtração dos valores do meio não estimulado para cada grupo analisado, e os pontos representam os valores individuais de cada paciente. Nas figuras A, B, C e D as cores dos pontos no grupo COVID-19 representam o grupo ao qual o paciente pertence (COV Uni, azul, ou COV Rec, vermelho). As diferenças entre grupos foram testadas por Mann-Whitney e o resultado considerado significativo quando  $p < 0,05$ .

Em sequência, o efeito da vacinação na frequência de células T multifuncionais foi avaliado nos diferentes grupos. Como observado na Figura 6, não foram encontradas diferenças significativas na proporção de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> multifuncionais de fenótipo duplo positivo ou triplo positivo, seja na avaliação dos grupos COV Único e COV Recorrente ou COV IgG- e IgG+ ou mesmo do grupo Controle quando comparados o Pré e Pós vacinação (Figura 6 A, B, C e D). Junto a isso, a avaliação das mudanças no padrão do fenótipo dos linfócitos T mostrou que os indivíduos do grupo COV-Recorrente apresentam predominância de IFN<sup>+</sup> nas células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antes da vacinação. Após a vacinação, os fenótipos CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> são amplamente substituídos por células TNF<sup>+</sup>. Da mesma forma, quando analisamos os indivíduos do grupo COV IgG-, há um padrão de predominância de IFN<sup>+</sup> nas células T. Por outro lado, os grupos COV-Único e COV IgG+ apresentam fenótipos semelhantes nas células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> antes e após a vacinação. (Figura 6 E).

**Figura 6** Análise da influência de vacinação no perfil fenotípico de linfócitos T multifuncionais



Células mononucleares de pacientes foram estimuladas com S1 por 18h e avaliadas de acordo com a porcentagem de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> multifuncionais no período antes da vacinação (Pré) e após a vacinação (Pós) para os pacientes do grupo Controle (n = 10) e com história da COVID-19 (n = 9), apresentados como COV Único e COV Recorrente (A e B) ou IgG- e IgG+ (C e D). As diferenças entre grupos foram testadas por Mann-Whitney (para diferentes grupos) ou pré- e pós-vacinação por Wilcoxon (mesmo grupo pareado). O resultado considerado significativo quando  $p < 0,05$ . (E) Gráficos de pizza demonstrando proporções dos fenótipos para células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> em cada grupo do estudo antes e depois da vacinação. O padrão de fenótipos foi comparado pelo teste de permutação parcial não paramétrico e os valores de p em negrito indicam diferenças significativas

### 13 DISCUSSÃO

Com o objetivo de caracterizar o grupo de pacientes com recorrência de COVID-19, este estudo avaliou informações clínico-epidemiológicas, a RI de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e T CD8<sup>+</sup> e a produção de anticorpos destes pacientes comparando-os com controles, antes e após vacinação para SARS-CoV-2.

A ocorrência de sintomatologia clínica da COVID-19 após melhora de um primeiro quadro sintomatológico já é relatada na literatura, contudo ainda existe certo debate acerca do que pode estar causando o segundo quadro sintomatológico, uma reativação do vírus ou uma reinfecção. No contexto atual, e frente aos achados já relatados com o sequenciamento dos vírus que causaram o primeiro e segundo episódio da doença (TILLET; SEVINSKY; HARTLEY; et al., 2021; TO; HUNG; IP; et al., 2021), incluindo um do nosso grupo de pesquisa (SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021), a reinfecção é uma hipótese bastante plausível. Contudo, alguns estudos sugerem persistência viral, na qual o vírus pode ficar em estado de latência nas células, sem causar doença por algum tempo, reincidindo posteriormente (WANG; XU; JIANG; et al., 2020; YE; PAN; PAN; et al., 2020; YUAN; LIU; YANG; et al., 2020). Todos os pacientes incluídos no presente estudo relataram cumprimento do prazo de quarentena (14 dias), melhora clínica total e tiveram recorrência dos sintomas de COVID-19 e detecção molecular do SARS-CoV-2 por qPCR pelo menos 30 dias após voltarem às suas atividades diárias normais, o que sugere quadro de reinfecção. No entanto, não foi possível realizar sequenciamento dos vírus envolvidos nos diferentes episódios da doença e, logo, não é possível confirmar a causa da recorrência COVID-19 nos pacientes aqui inclusos.

Ser do sexo feminino, ter necessidade de atendimento na unidade de urgência durante a doença, ter comorbidades e ser profissional de saúde foram características associadas à recorrência da COVID-19 no presente estudo. A presença de sintomatologia e necessidade de atendimento médico é compatível com relatos prévios na literatura e confirma a associação desses fatores com a recorrência da COVID-19 (WANG; XU; JIANG; et al., 2020; YE; PAN; PAN; et al., 2020; SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021). É plausível sugerir que a frequência de profissionais de saúde no grupo de pacientes com recorrência da COVID-19 possa ocorrer devido a uma maior exposição ao SARS-CoV-2. Contudo, é importante destacar o viés de seleção presente no recrutamento dos pacientes incluídos no estudo, que foram recrutados nos serviços do HU-UFS. Esta observação é pertinente também acerca da associação encontrada aqui entre a recorrência de COVID-19 e pessoas do sexo feminino,

uma vez que é sabido que as mulheres são maioria entre os profissionais de saúde no Brasil e no mundo (WERMELINGER; HELENA MACHADO; DE FÁTIMA LOBATO TAVARES; et al., 2010; BONIOL; MCISAAC; XU; et al., 2019; MUNABI; AUSLANDER; XEPOLEAS; et al., 2022).

A ocorrência de quadros de recorrência da COVID-19 é compatível com a ideia de que um mal funcionamento de algum aspecto do RI desenvolvida frente a infecção por SARS-CoV-2 possa estar envolvido (TAY; POH; RÉNIA; et al., 2020; SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021). A comparação da presença de anticorpos do tipo IgA e IgG contra SARS-CoV-2 na população avaliada no presente estudo não mostrou diferenças significativas entre os grupos, tanto antes quanto após a vacinação, apesar de ser possível observar uma frequência menor de pacientes positivos para anticorpos IgG (S1 e N) no grupo de pacientes com recorrência, quando comparado com pacientes que só tiveram um quadro de COVID-19. Níveis baixos ou a ausência de anticorpos neutralizantes após episódios de COVID-19 já foi descrita e presumivelmente associada à vulnerabilidade para uma nova infecção (REYNOLDS; SWADLING; GIBBONS; et al., 2020; SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021). Nesse sentido, é possível que o resultado encontrado aqui seja indicativo de baixa geração de anticorpos frente infecção natural da doença nos pacientes com recorrência da COVID-19. Ademais, o aumento na presença de anticorpos para a proteína S1 em todos os grupos somente após a vacinação reforça a noção de que a infecção natural da doença, mesmo após mais de um episódio, não seja tão eficaz na geração de anticorpos neutralizantes em algumas pessoas, e a importância da cobertura vacinal para o enfrentamento da pandemia.

O perfil de anticorpos advindos da vacinação foi bem evidente na amostra avaliada aqui e facilmente visualizado pela menor frequência de anticorpos para a proteína N do SARS-CoV-2 (ZHANG; ZENG; PAN; et al., 2021). Um estudo avaliando anticorpos após a vacinação em profissionais de saúde vacinados com a CoronaVac mostrou que a variação nos títulos de anticorpos parece ser dependente de alguns fatores como o índice de massa corporal e tabagismo (UYSAL; GÜMÜŞ; BEKTÖRE; et al., 2022). Associações com esses fatores não foram observadas no presente estudo, no entanto, o fato de nem todas as pessoas incluídas no grupo de recorrência da COVID-19 apresentarem os anticorpos pesquisados, merece atenção.

Alguns estudos já mostraram que células T de memória específicas para SARS-CoV-2 foram encontradas em indivíduos em fase convalescente independente da presença ou ausência de anticorpos (REYNOLDS; SWADLING; GIBBONS; et al., 2020; SEKINE; PEREZ-POTTI; RIVERA-BALLESTEROS; et al., 2020; HOU; ZHANG; TANG; et al., 2021) e independente da gravidade da doença (JUNG; RHA; SA; et al., 2021), sugerindo que

a exposição ou infecção natural tem potencial de prevenir episódios recorrentes de COVID-19 grave. Contudo, a disfunção das células TCD4 específicas para SARS-CoV-2 após um ano de infecção também foi relatada, sugerindo a necessidade de vacinação para prevenir reinfecção, mesmo em pessoas convalescentes para COVID-19 (HOU; ZHANG; TANG; et al., 2021). Até o momento não existem estudos avaliando as respostas de células T em pacientes com recorrência da COVID-19.

De maneira geral, o desenvolvimento da resposta T CD4 e CD8 propõe que as células T naíve, após contato com o antígeno específico, se diferenciam gradativamente em células T de memória central, com base em sua capacidade de produzir três citocinas: IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$ . Essas células podem produzir uma destas citocinas, serem duplas ou triplas produtoras e são chamadas multifuncionais, uma vez que são consideradas células de longa duração e possuem funções efetoras e proliferativas, o que as permite responder rapidamente a um segundo encontro com o antígeno (JUNG; RHA; SA; et al., 2021). Logo, a presença de células T multifuncionais é desejável após a fase convalescente da doença, ou a vacinação.

A caracterização dos linfócitos T CD4 e CD8 multifuncionais clássicas produtoras de IL-2, TNF- $\alpha$  e IFN- $\gamma$  de pacientes com quadros de recorrência da COVID-19 realizados no presente estudo não mostrou diferenças significativas entre este grupo e aqueles que apresentaram apenas um episódio de COVID-19. Contudo, os grupos de pacientes que tiveram COVID-19, independentemente do número de episódios, tiveram maior produção de células T CD8<sup>+</sup> duplas e triplas positivas quando comparados ao grupo controle, o que demonstra que a infecção natural da doença é capaz de gerar uma resposta imune adaptativa celular, mas isso não parece estar relacionado à recorrência da COVID-19. Ademais, a avaliação do padrão de resposta de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> por meio da clusterização realizada por análise de componente principal demonstra que não existe um padrão entre as respostas dos diferentes grupos analisados.

A avaliação da produção de citocinas pelas células mononucleares estimuladas não demonstra diferenças significativas entre os grupos estudados, apesar de diferenças visuais marcantes principalmente na produção de IFN- $\gamma$  (maior no grupo Controle). A produção de IFN- $\gamma$  é classicamente associada a uma efetiva montagem da RI à vírus e isso pode indicar a ativação efetiva das células desses pacientes sem história prévia da COVID-19, apesar desses pacientes serem negativos para IgG anti-S1 antes da vacinação

Em relação aos efeitos da vacinação, não foram encontradas diferenças significativas no percentual de linfócitos T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> quando cada grupo foi comparado entre si nos períodos pré e pós-vacinação. Coadunando com esses resultados, achados prévios na

literatura, como os de Sekine, Peres-Potti, Rivera Ballesteros et al. (2020), também não observaram diferenças significativas entre grupos de pacientes convalescentes que tiveram COVID-19 leve e convalescentes que tiveram COVID-19 grave quanto ao percentual de células TCD4<sup>+</sup> multifuncionais. O mesmo artigo observou diferenças entre os pacientes quanto ao percentual de células TCD8<sup>+</sup> na produção de IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , mas somente para células estimuladas com a proteína S do SARS-CoV-2 (SEKINE; PEREZ-POTTI; RIVERA-BALLESTEROS; et al., 2020). Também não foram encontradas diferenças significativas na frequência de células T multifuncionais CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> específicas para SARS-CoV-2 em diferentes tempos após a infecção (JUNG; RHA; SA; et al., 2021).

Contudo, a vacinação alterou o padrão fenotípico em células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. O grupo COV-Recorrente teve resposta predominante de IFN- $\gamma$  antes da vacinação, enquanto as células expressando TNF- $\alpha$  ganharam maior proporção após a imunização. Já os pacientes do grupo COV-Único tiveram distribuição mais igualitária entre as três citocinas analisadas antes e após a vacinação, com leve aumento na presença de TNF- $\alpha$ . Recentemente, van der Ploeg e colaboradores (2022) demonstraram que o fenótipo CD4<sup>+</sup>TNF $\alpha$ <sup>+</sup> está relacionado a uma melhor resposta e períodos tardios após a infecção por SARS-CoV-2, enquanto as células T IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> foram detectadas em tempo precoce e não fortemente associadas a proteção (VAN DER PLOEG; KIROSINGH; MORI; et al., 2022). Além disso, o mesmo estudo associou a presença de CD4<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> à produção de anticorpos neutralizantes de SARS-COV-2 e que a vacinação induz resposta diferente da infecção natural (VAN DER PLOEG; KIROSINGH; MORI; et al., 2022). Portanto, os resultados mostrados aqui sugerem que o grupo COV-Recorrente pode desenvolver uma proteção parcial durante múltiplos episódios de COVID-19 e a vacinação induz mudanças no padrão de resposta mais relacionadas à proteção efetiva.

A ausência de diferenças significativas na proporção de células T multifuncionais entre o grupo COV-Rec e COV-Uni evidencia que outros mecanismos da RI efetora podem estar envolvidos nesses episódios de recorrência. O trabalho prévio publicado pelo grupo de pesquisa com pacientes com recorrência da COVID-19 demonstrou a associação de níveis mais baixos de anticorpos IgG para SARS-CoV-2 com a recorrência da doença (SANTOS; FILHO; SILVA; et al., 2021). Baseado nisso, os pacientes com história de COVID-19 incluídos no presente estudo foram agrupados em IgG<sup>-</sup> ou IgG<sup>+</sup> para a proteína S1 independentemente da quantidade de episódios da doença. Esta avaliação do fenótipo de células T multifuncionais demonstrou uma maior frequência de células T CD4<sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup> nos pacientes COV IgG<sup>+</sup> quando comparados aos outros grupos (grupo Controle e grupo IgG<sup>-</sup>). Adicionalmente, o grupo IgG<sup>+</sup> apresentou também maior frequência no

percentual de linfócitos T CD4 duplo positivos e T CD8 duplo e triplo positivos quando comparado aos pacientes Controle. Estes achados sugerem que a COVID-19 promove o desenvolvimento de uma RI celular com a maturação de linfócitos T e a produção de anticorpos.

Já é amplamente demonstrado na literatura que a vacinação para COVID-19 não está diretamente associada a produção de linfócitos T multifuncionais, apesar de induzir proteção contra novas infecções (LI; MUFTUOGLU; LIANG; et al., 2022; UYSAL; GÜMÜŞ; BEKTÖRE; et al., 2022) e evidenciam a associação da presença de linfócitos T multifuncionais com proteção natural contra o SARS-CoV-2, seja em pacientes convalescentes da doença ou meses após a doença (SEKINE; PEREZ-POTTI; RIVERA-BALLESTEROS; et al., 2020; JUNG; RHA; SA; et al., 2021; AHMED; QUADEER; MCKAY, 2022). No presente trabalho, o percentual de células T multifuncionais não se correlacionou significativamente com os valores de densidade óptica das dosagens de IgG anti-S1 para nenhum dos grupos avaliados. É imprescindível salientar que a baixa frequência de linfócitos T primados para o SARS-CoV-2 e a ausência de anticorpos anti-S1 detectáveis em indivíduos convalescentes de um ou mais episódios a COVID-19 sugere que estes podem apresentar falhas em dois aspectos parcialmente independentes da RI e, portanto, podem ser mais susceptíveis a quadros de recorrência da COVID-19.

Em resumo, os achados descritos aqui sugerem que a presença de células T multifuncionais (IFN- $\gamma$ , IL-2 E TNF- $\alpha$ ) parecem não ser envolvidas diferencialmente na ocorrência de quadros de recorrência da COVID-19, mas a ausência de anticorpos anti-S1 é relacionada com uma menor frequência de células T CD4+, independentemente do número de episódios de COVID-19. Ainda, os dados reforçam a importância da vacinação para a formação de anticorpos contra o SARS-CoV-2 e para a alteração do padrão dos fenótipos das células T. Juntos, os resultados contribuem para o entendimento dos quadros de recorrência da COVID-19, indicando que a investigação do perfil celular a partir de outros marcadores pode ser importante para uma melhor caracterização desde grupo de pacientes.

## 14 CONCLUSÕES

A partir do presente estudo pode-se concluir que:

- Ter comorbidades e procurar atendimento na unidade de urgência foi associado à recorrência da COVID-19 nessa população;
- A vacinação promoveu aumento significativo na produção de anticorpos do tipo IgG para a proteína S1 do SARS-CoV-2 em pacientes que tiveram recorrência da COVID-19, pacientes que tiveram um único quadro de COVID-19 e nos controles sem doença, demonstrando um efeito da vacinação na indução da resposta humoral;
- A vacinação foi capaz de estimular a produção de anticorpos do tipo IgG e IgA para proteína S1 e IgG para a proteína N do SARS-CoV-2 em pacientes com recorrência da COVID-19, pacientes que tiveram um único quadro de COVID-19 e nos controles sem doença, porém esse perfil não contempla todos os integrantes do estudo;
- Pacientes com recorrência da COVID-19 e pacientes que tiveram um único episódio da doença tiveram uma maior proporção de células T CD8<sup>+</sup> dupla-positivas (CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>; CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) e triplas-positivas (CD8<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup>) quando comparados ao grupo Controle;
- Indivíduos com pelo menos um episódio de COVID-19 e IgG<sup>+</sup> tiveram uma maior produção de células T CD4<sup>+</sup>IFN- $\gamma$ <sup>+</sup>IL-2<sup>+</sup>TNF- $\alpha$ <sup>+</sup> quando comparados ao grupo Controle e ao grupo COV IgG<sup>-</sup>;
- A vacinação pode alterar o padrão dos fenótipos das células T, nos grupos de pacientes avaliados.
- Não há diferenças significativas no percentual de células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> single, duplas ou triplas multifuncionais expressando IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF $\alpha$  entre pacientes que tiveram COVID-19 recorrente e os que tiveram apenas um quadro de COVID-19 antes ou após a vacinação contra COVID-19, na população avaliada.

## 15 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As infecções pelo SARS-CoV-2 e pelo *vírus Zika* são um grave problema de saúde pública em diversas regiões do globo e, apesar dos esforços gerais da comunidade científica, diversos aspectos da patogênese causada por estes vírus ainda permanecem sem esclarecimento. Dentre estes, fatores de risco para a ocorrência da SCZ, o mais devastador desfecho da infecção pelo *vírus Zika*, e a ocorrência de quadros de recorrência da COVID-19 em uma pequena parcela da população, são pontos de destaque.

Os resultados dos estudos conduzidos aqui sugerem que a genética materna é um fator importante para a ocorrência da SCZ e, do mesmo modo, que a genética do conceito pode contribuir tanto para a ocorrência quanto para a gravidade da SCZ. As variações genéticas do tipo SNP associadas à infecção no presente trabalho corroboram a tese de que a modulação gênica nos eventos da RI inata são fator importante para os acontecimentos que levam a ocorrência da SCZ. Ademais, os dados apresentados aqui sugerem que células T multifuncionais produtoras de IFN- $\gamma$ , IL-2 e TNF- $\alpha$  duplas ou triplas positivas para estas citocinas, não são um fator relevante para a ocorrência de quadros de recorrência da COVID-19. Ainda, os dados revelaram que independentemente da quantidade de episódios de COVID-19, alguns indivíduos não possuem IgG contra a proteína S1 do SARS-CoV-2 e possuem concomitantemente baixa frequência de células T multifuncionais, o que é um ponto de atenção. Contudo, dada as limitações deste estudo, novos trabalhos avaliando estes aspectos são requeridos.

O presente trabalho lança luz a estes aspectos supracitados, trazendo informações que contribuem para uma melhor compreensão dos fatores associados às infecções por SARS-CoV-2 e pelo *vírus Zika*, assim como coloca pontos de destaque candidatos para futuros estudos.

## REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia Celular e Molecular**. 8 ed ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2015.
- ABBINK, P.; STEPHENSON, K. E.; BAROUCH, D. H. Zika virus vaccines. **Nature Reviews Microbiology**, v. 16, n. 10, p. 594–600, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0039-7>>.
- 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>>.
- ADEDOKUN, S. A.; SEAMANS, B. N.; COX, N. T.; et al. Interleukin-4 and STAT6 promoter polymorphisms but not interleukin-10 or 13 are essential for schistosomiasis and associated disease burden among Nigerian children. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 65, n. July, p. 28–34, 2018.
- AHMED, S. F.; QUADEER, A. A.; MCKAY, M. R. SARS-CoV-2 T Cell Responses Elicited by COVID-19 Vaccines or Infection Are Expected to Remain Robust against Omicron. **Viruses**, v. 14, n. 1, p. 4–9, 2022.
- AKKIZ, H. The Biological Functions and Clinical Significance of SARS-CoV-2 Variants of Concern. **Frontiers in Medicine**, v. 9, n. May, p. 1–15, 2022.
- 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>>.
- ALAVI DARAZAM, I.; SHOKOUHI, S.; POURHOSEINGHOLI, M. A.; et al. Role of interferon therapy in severe COVID-19: the COVIFERON randomized controlled trial. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–11, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-86859-y>>.
- ALBERTS, JOHNSON, LEWINS, et al. **Biologia Molecular da Célula**. 6. ed ed. Porto Alegre: Artmed, 2017.
- ALDASORO ARGUINANO, A. A.; DADÉ, S.; STATHOPOULOU, M.; et al. TREM-1 SNP rs2234246 regulates TREM-1 protein and mRNA levels and is associated with plasma levels of L-selectin. **PLoS ONE**, v. 12, n. 8, p. 1–16, 2017.
- ALEEM, A.; AKBAR SAMAD, A. B.; SLENKER, A. K. **Emerging Variants of SARS-CoV-2 And Novel Therapeutics Against Coronavirus (COVID-19)**. [s.l.] StatPearls [Internet], 2022.
- ALLCOCK, R. J. N.; BARROW, A. D.; FORBES, S.; et al. The human TREM gene cluster at 6p21.1 encodes both activating and inhibitory single IgV domain receptors and includes NKp44. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 2, p. 567–577, 2003.
- ANASTASSOPOULOU, C.; GKIZARIOTI, Z.; PATRINOS, G. P.; et al. Human genetic factors associated with susceptibility to SARS-CoV-2 infection and COVID-19 disease

severity. **Human Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–8, 2020.

ANDIA, D. C.; DE OLIVEIRA, N. F. P.; LETRA, A. M.; et al. Interleukin-8 Gene Promoter Polymorphism (rs4073) May Contribute to Chronic Periodontitis. **Journal of Periodontology**, v. 82, n. 6, p. 893–899, 2011.

ARAGÃO, M.F.V.; LINDEN, V.; BRAINER-LIMA, A. M. et 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>>.

ASKAR, E.; RAMADORI, G.; MIHM, S. Toll-like receptor 7 rs179008/Gln11Leu gene variants in chronic hepatitis C virus infection. **Journal of Medical Virology**, v. 82, n. 11, p. 1859–1868, 17 set. 2010. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.21893>>.

AZAMOR, T.; CUNHA, D. P.; DA SILVA, A. M. V.; et al. Congenital Zika Syndrome Is Associated With Interferon Alfa Receptor 1. **Frontiers in Immunology**, v. 12, n. November, p. 1–13, 2021.

AZAR, P.; MEJÍA, J. E.; CENAC, C.; et al. TLR7 dosage polymorphism shapes interferogenesis and HIV-1 acute viremia in women. **JCI Insight**, v. 5, n. 12, 2020.

BARBEITO-ANDRÉS, J.; PEZZUTO, P.; HIGA, L. M.; et al. Congenital Zika syndrome is associated with maternal protein malnutrition. **Science Advances**, v. 6, n. 2, 2020.

BARBEITO-ANDRÉS, J.; SCHULER-FACCINI, L.; GARCEZ, P. P. Why is congenital Zika syndrome asymmetrically distributed among human populations? **PLoS Biology**, v. 16, n. 8, p. 1–11, 2018.

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>>.

BEZERRA-SANTOS, M.; DO VALE-SIMON, M.; BARRETO, A. S.; et al. Mycobacterium leprae Recombinant Antigen Induces High Expression of Multifunction T Lymphocytes and Is Promising as a Specific Vaccine for Leprosy. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. December, p. 1–10, 2018.

BLEHARSKI, J. R.; KIESSLER, V.; BUONSANTI, C.; et al. A Role for Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 in Host Defense During the Early-Induced and Adaptive Phases of the Immune Response. **The Journal of Immunology**, v. 170, n. 7, p. 3812–3818, 2003.

BOMFIM, L. G. S.; MAGALHÃES, L. S.; SANTOS-FILHO, M. A. A.; et al. Leishmania infantum induces the release of sTREM-1 in visceral leishmaniasis. **Frontiers in Microbiology**, v. 8, n. NOV, p. 1–8, 2017.

BONIOL, M.; MCISAAC, M.; XU, L.; et al. Gender equity in the health workforce: Analysis of 104 countries. **World Health Organization**, n. March, p. 1–8, 2019. Disponível em: <<https://apps.who.int/iris/handle/10665/311314>>.

BOUCHON, A.; HERNÁNDEZ-MUNAIN, C.; CELLA, M.; et al. A DAP12-mediated

pathway regulates expression of CC chemokine receptor 7 and maturation of human dendritic cells. **Journal of Experimental Medicine**, v. 194, n. 8, p. 1111–1122, 2001.

BOUCHON, A.; DIETRICH, J.; COLONNA, M. Cutting Edge: Inflammatory Responses Can Be Triggered by TREM-1, a Novel Receptor Expressed on Neutrophils and Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 164, n. 10, p. 4991–4995, 2000.

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. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Situação epidemiológica da síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em 2020: até a SE 45. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**, v. 51, n. 28, p. 23–28, 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/July/14/Boletim-epidemiologico-SVS-28-v2.pdf>>.

BRASIL. **Boletim Epidemiológico 19 - Monitoramento dos casos de arboviroses até a semana epidemiológica 9 de 2022**. [s.l: s.n.]v. 53

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, 2016a.

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. 2016b. Disponível em: <<http://www.nejm.org/doi/10.1056/NEJMoa1602412>>. Acesso em: 25 nov. 2018.

BRASIL, P.; VASCONCELOS, Z.; KERIN, T.; et al. Zika virus vertical transmission in children with confirmed antenatal exposure. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–8, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-17331-0>>.

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>>.

CAUCHEMEZ, S.; BESNARD, M.; BOMPARD, P.; et al. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013-15: A retrospective study. **The Lancet**, v. 387, n. 10033, p. 2125–2132, 2016.

CAVALCANTI, L. P. de G.; FREITAS, A. R. R.; BRASIL, P.; et al. Surveillance of deaths caused by arboviruses in Brazil: From dengue to Chikungunya. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 112, n. 8, p. 583–585, 2017.

CHAUDHARY, V.; YUEN, K.-Y. K.-S.; CHAN, J. F.-W.; et al. Selective Activation of Type II Interferon. **Journal of Virology**, v. 91, n. 14, p. 1–17, 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35487581/>>.

CHEN, C. H.; HO, C. H.; HU, S. W.; et al. Association between interleukin-8 rs4073 polymorphism and prostate cancer: A meta-analysis. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 119, n. 7, p. 1201–1210, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jfma.2019.10.016>>.

CHEN, J.; VULLIKANTI, A.; SANTOS, J.; et al. Epidemiological and economic impact of COVID-19 in the US. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-021-99712-z>>.

CHEN, N.; ZHOU, M.; DONG, X.; et al. Epidemiological and clinical characteristics of 99 cases of 2019 novel coronavirus pneumonia in Wuhan, China: a descriptive study. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 507–513, 2020. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30211-7](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30211-7)>.

CHIA, P. Y.; COLEMAN, K. K.; TAN, Y. K.; et al. Detection of air and surface contamination by SARS-CoV-2 in hospital rooms of infected patients. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, 2020.

CHIANG, S.; UBOGU, E. E. The role of chemokines in guillain-barré syndrome. **Muscle and Nerve**, v. 48, n. 3, p. 320–330, 2013.

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>>.

DA SILVA-NETO, P. V.; DE CARVALHO, J. C. S.; PIMENTEL, V. E.; et al. Strem-1 predicts disease severity and mortality in covid-19 patients: Involvement of peripheral blood leukocytes and mmp-8 activity. **Viruses**, v. 13, n. 12, p. 1–17, 2021.

DA SILVA, A. A. M.; GANZ, J. S. S.; SOUSA, P. da S.; et al. Early growth and neurologic outcomes of infants with probable congenital Zika virus syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, v. 22, n. 11, p. 1953–1956, 2016.

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>>.

DE BRUIN, S.; BOS, L. D.; VAN ROON, M. A.; et al. Clinical features and prognostic

factors in Covid-19: A prospective cohort study. **EBioMedicine**, v. 67, p. 1–9, 2021.

DE NORONHA, L.; ZANLUCA, C.; AZEVEDO, M. L. V.; et al. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 111, n. 5, p. 287–293, 2016.

DE SOUSA, J. R.; AZEVEDO, R. S. S.; MARTINS FILHO, A. J.; et al. Correlation between Apoptosis and in Situ Immune Response in Fatal Cases of Microcephaly Caused by Zika Virus. **American Journal of Pathology**, v. 188, n. 11, p. 2644–2652, 2018. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.ajpath.2018.07.009>>.

DEMEY, B.; DAHER, N.; FRANÇOIS, C.; et al. Dynamic profile for the detection of anti-SARS-CoV-2 antibodies using four immunochromatographic assays. **Journal of Infection**, v. 81, n. 2, p. e6–e10, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.04.033>>.

DENNER, J.; ESCHRICHT, M.; LAUCK, M.; et al. Modulation of Cytokine Release and Gene Expression by the Immunosuppressive Domain of gp41 of HIV-1. **PLoS ONE**, v. 8, n. 1, 2013.

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.

DING, S.; LIANG, T. J. Is SARS-CoV-2 Also an Enteric Pathogen With Potential Fecal–Oral Transmission? A COVID-19 Virological and Clinical Review. **Gastroenterology**, v. 159, n. 1, p. 53–61, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1053/j.gastro.2020.04.052>>.

DOS SANTOS, C. A.; BEZERRA, G. V. B.; DE AZEVEDO MARINHO, A. R. R. A.; et al. SARS-CoV-2 genomic surveillance in Northeast Brazil: timing of emergence of the Brazilian variant of concern P1. **Journal of Travel Medicine**, v. 28, n. 7, p. 1–3, 2021.

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>>.

ELLINGHAUS, D.; DEGENHARDT, F.; BUJANDA, L.; et al. Genomewide Association Study of Severe Covid-19 with Respiratory Failure. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 16, p. 1522–1534, 2020.

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>>.

ELONG NGONO, A.; YOUNG, M. P.; BUNZ, M.; et al. CD4+ T cells promote humoral immunity and viral control during Zika virus infection. **PLoS pathogens**, v. 15, n. 5, p. e1007821, 2019.

ESPOSITO, S.; ZAMPIERO, A.; PUGNI, L.; et al. Genetic polymorphisms and sepsis in premature neonates. **PLoS ONE**, v. 9, n. 7, p. 1–9, 2014.

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.

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.

FREITAS, D. A.; SOUZA-SANTOS, R.; CARVALHO, L. M. A.; et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. **PLoS ONE**, v. 15, n. 12 December, p. 1–27, 2020.

GOLOVKIN, A. S.; PONASENKO, A. V.; KHUTORNAYA, M. V.; et al. Association of TLR and TREM-1 gene polymorphisms with risk of coronary artery disease in a Russian population. **Gene**, v. 550, n. 1, p. 101–109, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.gene.2014.08.022>>.

GOMES, J. A.; SGARIONI, E.; BOQUETT, J. A.; et al. Association between genetic variants in nos2 and tnf genes with congenital zika syndrome and severe microcephaly. **Viruses**, v. 13, n. 2, p. 1–13, 2021.

GÓMEZ-PIÑA, V.; SOARES-SCHANOSKI, A.; RODRÍGUEZ-ROJAS, A.; et al. Metalloproteinases Shed TREM-1 Ectodomain from Lipopolysaccharide-Stimulated Human Monocytes. **The Journal of Immunology**, v. 179, n. 6, p. 4065–4073, 2007.

GONZALES, J. R.; GRÖGER, S.; HALEY, G.; et al. The interleukin-4 -34TT and -590TT genotype is correlated with increased expression and protein production in aggressive periodontitis. **Molecular Immunology**, v. 47, n. 4, p. 701–705, 2010.

GONZALEZ-HORMAZABAL, P.; RETAMALES-ORTEGA, R.; MUSLEH, M.; et al. Polymorphisms PSCA rs2294008, IL-4 rs2243250 and MUC1 rs4072037 are associated with gastric cancer in a high risk population. **Molecular Biology Reports**, v. 47, n. 11, p. 9239–9243, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s11033-020-05943-0>>.

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, out. 2018.

GORBALENYA, A. E.; BAKER, S. C.; BARIC, R. S.; et al. The species Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus: classifying 2019-nCoV and naming it SARS-CoV-2. **Nature Microbiology**, v. 5, n. 4, p. 536–544, 2020.

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.

GRIFONI, A.; PHAM, J.; SIDNEY, J.; et al. Prior Dengue Virus Exposure Shapes T Cell Immunity to Zika Virus in Humans. **Journal of Virology**, v. 91, n. 24, p. 1–19, 2017.

GUBLER, D. J.; VASILAKIS, N.; MUSSO, D. History and Emergence of Zika Virus. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. Suppl 10, p. S860–S867, 2017.

GUO, S.; LIU, K.; ZHENG, J. The Genetic Variant of SARS-CoV-2: Would it matter for

Controlling the Devastating Pandemic? **International Journal of Biological Sciences**, v. 17, n. 6, p. 1476–1485, 2021.

GUTIÉRREZ-BUGALLO, G.; PIEDRA, L. A.; RODRIGUEZ, M.; et al. Vector-borne transmission and evolution of Zika virus. **Nature Ecology and Evolution**, v. 3, n. 4, p. 561–569, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41559-019-0836-z>>.

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.

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>>.

HCINI, N.; KUGBE, Y.; RAFALIMANANA, Z. H. L.; et al. Association between confirmed congenital Zika infection at birth and outcomes up to 3 years of life. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–9, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-23468-3>>.

HEMMER, C. J.; LÖBERMANN, M.; REISINGER, E. C. COVID-19: Epidemiologie und Mutationen. **Der Radiologe**, v. 61, n. 10, p. 880–887, out. 2021.

HIRSCH, A. J.; ROBERTS, V. H. J.; GRIGSBY, P. L.; et al. Zika virus infection in pregnant rhesus macaques causes placental dysfunction and immunopathology. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 2018. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-017-02499-9>>.

HOU, H.; ZHANG, Y.; TANG, G.; et al. Immunologic memory to SARS-CoV-2 in convalescent COVID-19 patients at 1 year postinfection. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 148, n. 6, p. 1481–1492.e2, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jaci.2021.09.008>>.

HUANG, C.; WANG, Y.; LI, X.; et al. Clinical features of patients infected with 2019 novel coronavirus in Wuhan, China. **The Lancet**, v. 395, n. 10223, p. 497–506, 2020.

HULL, J.; THOMSON, A.; KWIATKOWSKI, D. Association of respiratory syncytial virus bronchiolitis with the interleukin 8 gene region in UK families. **Thorax**, v. 55, n. 12, p. 1023–1027, 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>>.

JAFARZADEH, A.; FOOLADSERESHT, H.; NEMATI, M.; et al. Higher circulating levels of chemokine CXCL10 in patients with breast cancer: Evaluation of the influences of tumor stage and chemokine gene polymorphism. **Cancer Biomarkers**, v. 16, n. 4, p. 545–554, 2016.

JIA, Y.; XIE, X.; SHI, X.; et al. Associations of common IL-4 gene polymorphisms with cancer risk: A meta-analysis. **Molecular Medicine Reports**, v. 16, n. 2, p. 1927–1945, 2017.

JOHANSSON, M. A.; QUANDELACY, T. M.; KADA, S.; et al. SARS-CoV-2 Transmission from People without COVID-19 Symptoms. **JAMA Network Open**, v. 4, n. 1, p. 4–11, 2021.

- JUNG, J. H.; RHA, M. S.; SA, M.; et al. SARS-CoV-2-specific T cell memory is sustained in COVID-19 convalescent patients for 10 months with successful development of stem cell-like memory T cells. **Nature Communications**, v. 12, n. 1, p. 1–12, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41467-021-24377-1>>.
- 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.
- KAMALI-SARVESTANI, E.; ALIPARASTI, M. R.; ATEFI, S. Association of interleukin-8 (IL-8 or CXCL8) -251T/A and CXCR2 +1208C/T gene polymorphisms with breast cancer. **Neoplasma**, v. 54, n. 6, p. 484–489, 2007.
- KAYE, A. D.; OKEAGU, C. N.; PHAM, A. D.; et al. Economic impact of COVID-19 pandemic on healthcare facilities and systems: International perspectives. **Best Practice and Research: Clinical Anaesthesiology**, v. 35, n. 3, p. 293–306, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.bpa.2020.11.009>>.
- 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.
- LAKE, M. A. What we know so far: COVID-19 current clinical knowledge and research. **Clinical medicine (London, England)**, v. 20, n. 2, p. 124–127, 2020.
- 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.
- LI, C.-H.; YANG, Y.-C.; HSIA, T.-C.; et al. Association of Interleukin-8 Promoter Genotypes With Taiwan Lung Cancer Risk. **Anticancer Research**, v. 42, n. 3, p. 1229–1236, 26 mar. 2022. Disponível em: <<http://ar.iiarjournals.org/lookup/doi/10.21873/anticanres.15590>>.
- LI, L.; MUFTUOGLU, M.; LIANG, S.; et al. In-depth analysis of SARS-CoV-2-specific T cells reveals diverse differentiation hierarchies in vaccinated individuals. **JCI Insight**, v. 7, n. 7, 2022.
- LI, Q.; GUAN, X.; WU, P.; et al. Early Transmission Dynamics in Wuhan, China, of Novel Coronavirus-Infected Pneumonia. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 13, p. 1199–1207, 2020.
- LI, Q.; WANG, Y.; SUN, Q.; et al. Immune response in COVID-19: what is next? **Cell Death & Differentiation**, n. April, p. 1–16, 2022.
- LIU, F.; ZHANG, X. G.; ZHANG, B.; et al. TREM1: A positive regulator for inflammatory response via NF- $\kappa$ B pathway in A549 cells infected with *Mycoplasma pneumoniae*. **Biomedicine and Pharmacotherapy**, v. 107, n. July, p. 1466–1472, 2018.
- LIU, L.; DONG, H.; CHEN, H.; et al. Flavivirus RNA cap methyltransferase: Structure, function, and inhibition. **Frontiers of Biology in China**, v. 5, n. 4, p. 286–303, 2010.
- LIU, M.; GUO, S.; HIBBERT, J. M.; et al. CXCL10/IP-10 in infectious diseases pathogenesis and potential therapeutic implications. **Cytokine and Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 3, p. 121–130, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.cytogfr.2011.06.001>>.

LIU, Y.; YAN, W.; TAN, C.; et al. Common Variant in TREM1 Influencing Brain Amyloid Deposition in Mild Cognitive Impairment and Alzheimer ' s Disease. **Neurotoxicity Research**, n. 12, p. 661–668, 2020.

LIU, Z. Y.; SHI, W. F.; QIN, C. F. The evolution of Zika virus from Asia to the Americas. **Nature Reviews Microbiology**, v. 17, n. 3, p. 131–139, 2019. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41579-018-0134-9>>.

LU, R.; ZHAO, X.; LI, J.; et al. Genomic characterisation and epidemiology of 2019 novel coronavirus: implications for virus origins and receptor binding. **The Lancet**, v. 395, n. 10224, p. 565–574, 2020. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736\(20\)30251-8](http://dx.doi.org/10.1016/S0140-6736(20)30251-8)>.

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>> <http://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](http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742015000400021&scielo=S2237-96222015000400785)>.

LYTRAS, T.; TSIODRAS, S. Lockdowns and the COVID-19 pandemic: What is the endgame? **Scandinavian Journal of Public Health**, v. 49, n. 1, p. 37–40, 2021.

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.

MAGALHÃES, L. S.; MELO, E. V.; DAMASCENA, N. P.; et al. Use of N-acetylcysteine as treatment adjuvant regulates immune response in visceral leishmaniasis: Pilot clinical trial and in vitro experiments. **Frontiers in Cellular and Infection Microbiology**, v. 12, n. November, p. 1–10, 2022. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2022.1045668/full>>.

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.

MINASHKIN, M. M.; GRIGORTSEVICH, N. Y.; KAMAEVA, A. S.; et al. The Role of Genetic Factors in the Development of Acute Respiratory Viral Infection COVID-19: Predicting Severe Course and Outcomes. **Biomedicines**, v. 10, n. 3, 2022.

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>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico: Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**, v. 51, p. 31, 2020. Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/21/Boletim-epidemiologico-SVS-33.pdf>>.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico 44 -Monitoramento dos casos de arboviroses urbanas causados por vírus transmitidos pelo mosquito Aedes. **Boletim epidemiológico. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde**, v. 52, p. 1–10, 2021. Disponível em: <[https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim\\_epidemiologico\\_svs\\_36.pdf](https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/boletins-epidemiologicos/edicoes/2021/boletim_epidemiologico_svs_36.pdf)>.

MOHAMADZADEH, M.; COBERLEY, S. S.; OLINGER, G. G.; et al. Activation of Triggering Receptor Expressed on Myeloid Cells-1 on Human Neutrophils by Marburg and Ebola Viruses. **Journal of Virology**, v. 80, n. 14, p. 7235–7244, 2006.

MONDELLI, M. U.; COLANERI, M.; SEMINARI, E. M.; et al. Low risk of SARS-CoV-2 transmission by fomites in real-life conditions. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 5, p. e112, 2021. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30678-2](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30678-2)>.

MORAN, T. M.; ISOBE, H.; FERNANDEZ-SESMA, A.; et al. Interleukin-4 causes delayed virus clearance in influenza virus-infected mice. **Journal of Virology**, v. 70, n. 8, p. 5230–5235, 1996.

MUDD, P. A.; CRAWFORD, J. C.; TURNER, J. S.; et al. Distinct inflammatory profiles distinguish COVID-19 from influenza with limited contributions from cytokine storm. **Science Advances**, v. 6, n. 50, p. 16–18, 2020.

MUNABI, N. C. O.; AUSLANDER, A.; XEPOLEAS, M. D.; et al. The influence of an all-female healthcare environment on mentorship and empowerment of female healthcare professionals. **PLOS Global Public Health**, v. 2, n. 3, p. e0000081, 2022. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgph.0000081>>.

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.

MUSSO, D.; KO, A. I.; BAUD, D. Zika Virus Infection — After the Pandemic. **New England Journal of Medicine**, v. 381, n. 15, p. 1444–1457, 2019.

NASCIMENTO-CARVALHO, G. C.; NASCIMENTO-CARVALHO, E. C.; RAMOS, C. L.; et al. Zika-exposed microcephalic neonates exhibit higher degree of inflammatory imbalance in cerebrospinal fluid. **Scientific Reports**, v. 11, n. 1, p. 8474, 19 dez. 2021. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/s41598-021-87895-4>>.

NAVECA, F. G.; PONTES, G. S.; CHANG, A. Y. H.; et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, p. 1–13, 2018.

NAVECA, F. G.; NASCIMENTO, V.; DE SOUZA, V. C.; et al. COVID-19 in Amazonas, Brazil, was driven by the persistence of endemic lineages and P.1 emergence. **Nature Medicine**, v. 27, n. 7, p. 1230–1238, jul. 2021.

NETTO, E. M.; MOREIRA-SOTO, A.; PEDROSO, C.; et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the. **mBio**, v. 8, n. 6, p. 1–14, 2017.

NGUYEN, N. N.; HOUHAMDI, L.; HOANG, V. T.; et al. SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 severity. **Emerging Microbes and Infections**, v. 11, n. 1, p. 894–901, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1080/22221751.2022.2052358>>.

- NIELSEN-SAINES, K.; BRASIL, P.; KERIN, T.; et al. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. **Nature Medicine**, v. 25, n. 8, p. 1213–1217, 2019.
- NOAH, T. L.; HENDERSON, F. W.; WORTMAN, I. A.; et al. Nasal cytokine production in viral acute upper respiratory infection of childhood. **Journal of Infectious Diseases**, v. 171, n. 3, p. 584–592, 1995.
- NORDSTRÖM, P.; BALLIN, M.; NORDSTRÖM, A. Risk of SARS-CoV-2 reinfection and COVID-19 hospitalisation in individuals with natural and hybrid immunity: a retrospective, total population cohort study in Sweden. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 22, n. 6, p. 781–790, 2022.
- NOUJAIM, P. J.; JOLLY, D.; COUTUREAU, C.; et al. Fatigue and quality - of - life in the year following SARS - Cov2 infection. **BMC Infectious Diseases**, p. 4–11, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1186/s12879-022-07517-w>>.
- OHYAUCHI, M.; IMATANI, A.; YONECHI, M.; et al. The polymorphism interleukin 8 - 251 A/T influences the susceptibility of Helicobacter pylori related gastric diseases in the Japanese population. **Gut**, v. 54, n. 3, p. 330–335, 2005.
- OSPINA, M. L.; TONG, V. T.; GONZALEZ, M.; et al. Zika Virus Disease and Pregnancy Outcomes in Colombia. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. 537–545, 2020.
- PACHECO, O.; BELTRÁN, M.; NELSON, C. A.; et al. Zika Virus Disease in Colombia — Preliminary Report. **New England Journal of Medicine**, v. 383, n. 6, p. e44, 2020.
- PAHO, P. A. H. O.; WHO, W. H. O. **PAHO/WHO Data - Dengue Fever in The Americas Number of Reported Cases by Country or Territor-Brazil**. Disponível em: <<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/indicadores-dengue-en/dengue-nacional-en/252-dengue-pais-ano-en.html?start=2>>. Acesso em: 11 jun. 2022.
- PAIXAO, E. S.; CARDIM, L. L.; COSTA, M. C. N.; et al. Mortality from Congenital Zika Syndrome — Nationwide Cohort Study in Brazil. **New England Journal of Medicine**, v. 386, n. 8, p. 757–767, 2022.
- PENG, L.; LI, J.; ZHOU, G.; et al. Relationships between genetic polymorphisms of triggering receptor expressed on myeloid cells-1 and septic shock in a Chinese Han population. **World J Emerg Med**, v. 6, n. 2, p. 123–130, 2015.
- PEREIRA NETO, T. A.; GONÇALVES-PEREIRA, M. H.; DE QUEIROZ, C. P.; et al. Multifunctional T cell response in convalescent patients two years after ZIKV infection. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 108, n. 4, p. 1265–1277, 2020.
- 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.

QIN, C.; ZHOU, L.; HU, Z.; et al. Dysregulation of immune response in patients with coronavirus 2019 (COVID-19) in Wuhan, China. **Clinical Infectious Diseases**, v. 71, n. 15, p. 762–768, 2020.

RABELO, K.; DE SOUZA, L. J.; SALOMÃO, N. G.; et al. Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 11, n. September, p. 1–15, 2020.

REGI, N.; REGI, N. Atualização epidemiológica: Arbovírus no contexto da. **Organização Pan-Americana da Saúde/ Organização Mundial da Saúde**, v. 19, p. 1–12, 2021.

REMICK, D. G. Interleukin-8. **Critical Care Medicine**, v. 33, n. 12 SUPPL., p. 466–467, 2005.

REN, S.-Y.; WANG, W.-B.; GAO, R.-D.; et al. Omicron variant (B.1.1.529) of SARS-CoV-2: Mutation, infectivity, transmission, and vaccine resistance. **World Journal of Clinical Cases**, v. 10, n. 1, p. 1–11, 2022.

REYNOLDS, C. J.; SWADLING, L.; GIBBONS, J. M.; et al. Discordant neutralizing antibody and T cell responses in asymptomatic and mild SARS-CoV-2 infection. **Science Immunology**, v. 3698, n. December, p. 15–18, 2020.

REYNOLDS, C. J.; WATBER, P.; SANTOS, C. N. O.; et al. Strong CD4 T Cell Responses to Zika Virus Antigens in a Cohort of Dengue Virus Immune Mothers of Congenital Zika Virus Syndrome Infants. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 185, 18 fev. 2020. Disponível em: <<https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2020.00185/full>>. Acesso em: 19 fev. 2020.

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.

ROEDERER, M.; NOZZI, J. L.; NASON, M. C. SPICE: Exploration and analysis of post-cytometric complex multivariate datasets. **Cytometry Part A**, v. 79A, n. 2, p. 167–174, fev. 2011. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/cyto.a.21015>>.

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>>.

ROSENWASSER, L. J.; KLEMM, D. J.; DRESBACK, J. K.; et al. Promoter polymorphisms in the chromosome 5 gene cluster in asthma and atopy. **Clinical and Experimental Allergy, Supplement**, v. 25, n. 2, p. 74–78, 1995.

ROSSI, Á. D.; FAUCZ, F. R.; MELO, A.; et al. Association between maternal non-coding interferon- $\lambda$  polymorphisms and congenital zika syndrome in a cohort from brazilian northeast. **Viruses**, v. 13, n. 11, p. 1–6, 2021.

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.

RUIZ-PACHECO, J. A.; VIVANCO-CID, H.; IZAGUIRRE-HERNÁNDEZ, I. Y.; et al. TREM-1 modulation during early stages of dengue virus infection. **Immunology Letters**, v. 158, n. 1–2, p. 183–188, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.imlet.2014.01.003>>.

SÁNCHEZ-LUQUEZ, K.; SCHADOCK, I. C.; GONÇALVES, C. V.; et al. Impact of TLR7 and TLR9 polymorphisms on susceptibility to placental infections and pregnancy complications. **Journal of Reproductive Immunology**, v. 146, n. March, 2021.

SANTOS, C. N. O.; RIBEIRO, D. R.; CARDOSO ALVES, J.; et al. Association between Zika Virus Microcephaly in Newborns with the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- $\alpha$  Gene. **Journal of Infectious Diseases**, v. 220, n. 11, p. 1797–1801, 2019.

SANTOS, L. A. dos; FILHO, P. G. de G.; SILVA, A. M. F.; et al. Recurrent COVID-19 including evidence of reinfection and enhanced severity in thirty Brazilian healthcare workers. **Journal of Infection**, v. 82, n. 3, p. 399–406, 2021.

SANTOS, M. L. B.; NICO, D.; DE OLIVEIRA, F. A.; et al. Leishmania donovani nucleoside Hydrolase (NH36) domains induce T-cell cytokine responses in human visceral leishmaniasis. **Frontiers in Immunology**, v. 8, n. MAR, 2017.

SEDER, R. A.; DARRAH, P. A.; ROEDERER, M. T-cell quality in memory and protection: Implications for vaccine design. **Nature Reviews Immunology**, v. 8, n. 4, p. 247–258, 2008.

SEKINE, T.; PEREZ-POTTI, A.; RIVERA-BALLESTEROS, O.; et al. Robust T Cell Immunity in Convalescent Individuals with Asymptomatic or Mild COVID-19. **Cell**, v. 183, n. 1, p. 158- 168.e14, 2020.

SENGUPTA, S.; MUKHERJEE, S.; BHATTACHARYA, N.; et al. Differential genotypic signatures of Toll-like receptor polymorphisms among dengue-chikungunya mono- and co-infected Eastern Indian patients. **European Journal of Clinical Microbiology and Infectious Diseases**, v. 40, n. 7, p. 1369–1381, 2021.

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>>.

SHI, J. X.; LI, J. S.; HU, R.; et al. Diagnostic Value of sTREM-1 in Bronchoalveolar Lavage Fluid in ICU Patients With Bacterial Lung Infections: A Bivariate Meta-Analysis. **PLoS ONE**, v. 8, n. 5, 2013.

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)>.

SOTOODEH GHORBANI, S.; TAHERPOUR, N.; BAYAT, S.; et al. Epidemiologic characteristics of cases with reinfection, recurrence, and hospital readmission due to COVID-19: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 1, p. 44–

53, 2022.

SOUZA, T.; KEESSEN, 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](http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/science.aaf8505/DC1)>.

SU, L.; LIU, C.; LI, C.; et al. Dynamic changes in serum soluble triggering receptor expressed on myeloid cells-1 (sTREM-1) and its gene polymorphisms are associated with sepsis prognosis. **Infection, Genetics and Evolution**, v. 39, n. 6, p. 1833–1843, 2012. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.meegid.2016.01.026>>.

TANG, J. W.; TAMBYAH, P. A.; HUI, D. S. Emergence of a new SARS-CoV-2 variant in the UK. **Journal of Infection**, v. 82, n. 4, p. e27–e28, abr. 2021.

TAY, M. Z.; POH, C. M.; RÉNIA, L.; et al. The trinity of COVID-19: immunity, inflammation and intervention. **Nature Reviews Immunology**, v. 20, n. 6, p. 363–374, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41577-020-0311-8>>.

TEBAS, P.; ROBERTS, C. C.; MUTHUMANI, K.; et al. Safety and Immunogenicity of an Anti-Zika Virus DNA Vaccine. **New England Journal of Medicine**, v. 385, n. 12, p. e35, 2021.

TEGALLY, H.; WILKINSON, E.; GIOVANETTI, M.; et al. Detection of a SARS-CoV-2 variant of concern in South Africa. **Nature**, v. 592, n. 7854, p. 438–443, abr. 2021.

TERRITORIES, U. S.; VANMALDEGHEM, K.; PRADO, M. V.; et al. Pregnancy Outcomes After Maternal Zika Virus Infection During Pregnancy —. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 66, n. 23, p. 615–621, 2017. Disponível em: <<http://www.mendeley.com/research/pregnancy-outcomes-after-maternal-zika-virus-infection-during-pregnancy-2>>.

THE LANCET RESPIRATORY MEDICINE. COVID-19 transmission—up in the air. **The Lancet Respiratory Medicine**, v. 8, n. 12, p. 1159, 2020.

TILLET, R. L.; SEVINSKY, J. R.; HARTLEY, P. D.; et al. Genomic evidence for reinfection with SARS-CoV-2: a case study. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 1, p. 52–58, 2021. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30764-7](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30764-7)>.

TO, K. K. W.; HUNG, I. F. N.; IP, J. D.; et al. Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Re-infection by a Phylogenetically Distinct Severe Acute Respiratory Syndrome Coronavirus 2 Strain Confirmed by Whole Genome Sequencing. **Clinical Infectious Diseases**, v. 73, n. 9, p. E2946–E2951, 2021.

TROEGER, C.; FOROUZANFAR, M.; RAO, P. C.; et al. Estimates of the global, regional, and national morbidity, mortality, and aetiologies of lower respiratory tract infections in 195 countries: a systematic analysis for the Global Burden of Disease Study 2015. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 17, n. 11, p. 1133–1161, 2017.

UYSAL, E. B.; GÜMÜŞ, S.; BEKTÖRE, B.; et al. Evaluation of antibody response after

COVID-19 vaccination of healthcare workers. **Journal of Medical Virology**, v. 94, n. 3, p. 1060–1066, mar. 2022. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/jmv.27420>>.

VAN DER PLOEG, K.; KIROSINGH, A. S.; MORI, D. A. M.; et al. TNF- $\alpha$ + CD4+ T cells dominate the SARS-CoV-2 specific T cell response in COVID-19 outpatients and are associated with durable antibodies. **Cell Reports Medicine**, v. 3, n. 6, p. 100640, 2022. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.xcrm.2022.100640>>.

VARONA, L.; GONZALES, J. R. Dynamics of the impact of COVID-19 on the economic activity of Peru. **PLoS ONE**, v. 16, n. 1 January, p. 1–30, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1371/journal.pone.0244920>>.

VICTOR, J.; SANTOS, G.; TORRES, S. A.; et al. Clinical and epidemiological aspects of patients infected with SARS-CoV-2 variants: a case-control study Aspectos clínicos e epidemiológicos de pacientes infectados com variantes do SARS-CoV-2: um estudo caso controle Aspectos clínicos y epidemiológicos. **Research, Society and Development**, v. 2022, p. 1–9, 2022.

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.

VINHAES, C. L.; ARRIAGA, M. B.; DE ALMEIDA, B. L.; et al. Newborns with zika virus-associated microcephaly exhibit marked systemic inflammatory imbalance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, p. 670–680, 2020.

WANG, F.; HOU, H.; LUO, Y.; et al. The laboratory tests and host immunity of COVID-19 patients with different severity of illness. **JCI Insight**, v. 5, n. 10, 2020.

WANG, Q.; ZHANG, Y.; WU, L.; et al. Structural and functional basis of SARS-CoV-2 entry by using human ACE2. **Cell**, p. 1–11, 2020.

WANG, X.; XU, H.; JIANG, H.; et al. Clinical features and outcomes of discharged coronavirus disease 2019 patients: A prospective cohort study. **Qjm**, v. 113, n. 9, p. 657–665, 2020.

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.

WEN, J.; WANG, Y. T.; VALENTINE, K. M.; et al. CD4+ T Cells Cross-Reactive with Dengue and Zika Viruses Protect against Zika Virus Infection. **Cell Reports**, v. 31, n. 4, 2020.

WERMELINGER, M.; HELENA MACHADO, M.; DE FÁTIMA LOBATO TAVARES, M.; et al. A Força de Trabalho do Setor de Saúde no Brasil. **Divulgação em Saúde para debate**, v. 45, p. 154–70, 2010. Disponível em: <[http://www.ensp.fiocruz.br/observarh/arquivos/A Forca de Trabalho do Setor de Saude no Brasil .pdf](http://www.ensp.fiocruz.br/observarh/arquivos/A%20Forca%20de%20Trabalho%20do%20Setor%20de%20Saude%20no%20Brasil.pdf)>.

WESTERHOF, L. M.; MCGUIRE, K.; MACLELLAN, L.; et al. Multifunctional cytokine

production reveals functional superiority of memory CD4 T cells. **European Journal of Immunology**, v. 49, n. 11, p. 2019–2029, 2019.

WHO. Zika Virus (ZIKV) Classification Table - Data as of 15 February 2018. **World Health Organization**, n. March, p. 1–2, 2018. Disponível em: <<http://apps.who.int/iris/bitstream/handle/10665/260419/zika-classification-15Feb18-eng.pdf?sequence=1>>.

WHO, W. H. O. **Coronavirus disease (COVID-19)**. Disponível em: <<https://www.who.int/emergencies/diseases/novel-coronavirus-2019>>. Acesso em: 15 jun. 2022a.

WHO, W. H. O. **WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard | WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard With Vaccination Data**. Disponível em: <<https://covid19.who.int/>>. Acesso em: 30 dez. 2022b.

WHO, W. H. O. Tracking SARS-CoV-2 variants. **World Health Organization (WHO)**, 2022c. Disponível em: <<https://www.who.int/activities/tracking-SARS-CoV-2-variants>>.

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>>.

XIAO, A. T.; GAO, C.; ZHANG, S. Profile of specific antibodies to SARS-CoV-2: The first report. **Journal of Infection**, v. 81, n. 1, p. 147–178, jul. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445320301389>>.

XIONG, Y.; LIU, Y.; CAO, L.; et al. Transcriptomic characteristics of bronchoalveolar lavage fluid and peripheral blood mononuclear cells in COVID-19 patients. **Emerging Microbes and Infections**, v. 9, n. 1, p. 761–770, 2020.

YAHAV, D.; YELIN, D.; ECKERLE, I.; et al. Definitions for coronavirus disease 2019 reinfection, relapse and PCR re-positivity. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 27, n. 3, p. 315–318, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cmi.2020.11.028>>.

YE, G.; PAN, Z.; PAN, Y.; et al. Clinical characteristics of severe acute respiratory syndrome coronavirus 2 reactivation. **Journal of Infection**, v. 80, n. 5, p. e14–e17, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.jinf.2020.03.001>>.

YEWDELL, J. W. Antigenic drift: Understanding COVID-19. **Immunity**, v. 54, n. 12, p. 2681–2687, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.immuni.2021.11.016>>.

YUAN, B.; LIU, H. Q.; YANG, Z. R.; et al. Recurrence of positive SARS-CoV-2 viral RNA in recovered COVID-19 patients during medical isolation observation. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 1–7, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1038/s41598-020-68782-w>>.

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.

ZEISER, F. A.; DONIDA, B.; DA COSTA, C. A.; et al. First and second COVID-19 waves in Brazil: A cross-sectional study of patients' characteristics related to hospitalization and in-hospital mortality. **The Lancet Regional Health - Americas**, v. 6, n. November 2021, p. 100107, 2022.

ZHANG, Q.; XIANG, R.; HUO, S.; et al. Molecular mechanism of interaction between SARS-CoV-2 and host cells and interventional therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, 2021. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41392-021-00653-w>>.

ZHANG, Y.; ZENG, G.; PAN, H.; et al. Safety, tolerability, and immunogenicity of an inactivated SARS-CoV-2 vaccine in healthy adults aged 18–59 years: a randomised, double-blind, placebo-controlled, phase 1/2 clinical trial. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 181–192, 2021. Disponível em: <[http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099\(20\)30843-4](http://dx.doi.org/10.1016/S1473-3099(20)30843-4)>.

ZHENG, M.; GAO, Y.; WANG, G.; et al. Functional exhaustion of antiviral lymphocytes in COVID-19 patients. **Cellular and Molecular Immunology**, v. 17, n. 5, p. 533–535, 2020. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1038/s41423-020-0402-2>>.

ZHU, N.; ZHANG, D.; WANG, W.; et al. A Novel Coronavirus from Patients with Pneumonia in China, 2019. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 8, p. 727–733, 2020.

## APÊNDICE A



### 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 *Chinkugunya*, 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 Nº: \_\_\_\_\_ Sexo : M  F   
 Data nascimento (dd/mm/aaaa) \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ .Nº \_\_\_\_\_  
 Bairro: \_\_\_\_\_ Cidade \_\_\_\_\_  
 CEP. \_\_\_\_\_ TEL.: ( ) \_\_\_\_\_

2. Responsável legal \_\_\_\_\_  
 Grau de Parentesco \_\_\_\_\_  
 Documento de Identidade: \_\_\_\_\_ Sexo: M  F   
 Data nascimento: (dd/mm/aaaa) \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_ .Nº \_\_\_\_\_  
 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 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, especificar: \_\_\_\_\_

**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, especifique: \_\_\_\_\_

**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-histimínico ( ) 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: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE C

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Nome do Projeto: *Estudo clínico-epidemiológico e geográfico, imunológico e genético da infecção pelo SARS-CoV-2 em Sergipe*

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_  
 Data de nascimento: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_  
 Endereço: \_\_\_\_\_  
 Telefone: \_\_\_\_\_ Registro.HU: \_\_\_\_\_ Nº Estudo: \_\_\_\_ - \_\_\_\_

Investigadores: Prof. Dr. Roque Pacheco de Almeida e Dra. Amélia Ribeiro de Jesus, Hospital Universitário Rua Cláudio Batista S.N, Bairro Sanatório, Aracajú, -Brasil., Tel.: (79)3218-1805.

Você é convidado(a) a participar de um estudo que tem como objetivo entender porque as pessoas têm COVID19. Este estudo incluirá pessoas com esta doença que apresentam formas diferentes dela. Além das informações deste documento você pode perguntar tudo sobre o estudo ao seu médico ou profissional da saúde que conversar com você sobre este estudo. Caso decida participar do estudo você será solicitado(a) assinar este formulário de consentimento.

A sua participação é voluntária. Você pode decidir não participar do estudo em qualquer momento, sem perder os benefícios dos cuidados médicos prestados e de seu tratamento. Caso, após aceite participar, resolva descontinuar sua participação, isto será feito sem qualquer prejuízo para você.

Este estudo irá avaliar como o seu corpo se defende quando é atacado pelo vírus que causa esta doença (COVID19). Para isto estudaremos o seu sangue e a secreção do nariz e boca feita por cotonetes.

Caso você concorde em participar do estudo, além de responder algumas perguntas sobre sua saúde, pode ser examinado por um médico clínico, métodos que são necessários para o diagnóstico da doença. Caso sinta-se constrangido ou desconfortável, você pode responder apenas aos questionamentos que não lhe causem desconforto e tem o direito de retirar e ou negar a sua participação a qualquer momento.

Você também doará aprox. 15 ml de sangue para a pesquisa dos mecanismos de defesa do organismo e o seu material genético (DNA) será também estudado. Também usaremos um cotonete para esfregar na parede de seu nariz e boca para o mesmo propósito.

Após a assinatura do termo de consentimento sua participação no estudo é de 4 anos, a contar do primeiro dia de tratamento. Periodicamente, você será examinado para determinar a cura da doença ou necessidade de utilização de novos procedimentos, que também lhe será realizado gratuitamente.

Qualquer informação obtida durante este estudo só será do conhecimento da equipe médica e do órgão que protege o indivíduo em pesquisas (Comitê de ética do Hospital Universitário). Seu nome será substituído por um código que criamos. Você e qualquer participante desse

estudo não será identificado por nome nas publicações dos resultados do estudo. Apenas os representantes do Comitê de Ética em Pesquisa poderão ver sua ficha clínica.

A retirada de seu sangue é feita usando uma seringa e agulha descartáveis. Dor leve na retirada de sangue devido à punção com agulha pode ocorrer. Em casos raros a retirada de sangue provoca sangramento ou mancha roxa na pele, então faremos uma compressa no local e colocaremos um curativo. O atendimento que você receberá é igual ao que todos os pacientes receberão participando ou não do estudo. A participação lhe trará como benefício um acompanhamento clínico mais frequente. Você deve retornar às consultas médicas regularmente de acordo com marcação de seu cartão do Ambulatório do HU.

A COVID19 é relacionada a reação do seu organismo contra o vírus que causa a doença e o conhecimento destas reações do seu corpo pode contribuir não só para o entendimento da doença como para o aparecimento de novas formas de tratamento ou controle os sintomas e também formas de prevenir a doença.

Você não terá custos com o tratamento. Você não receberá pagamento por sua participação neste estudo. Reafirmamos que caso sinta-se constrangido ou desconfortável, você tem o direito de retirar e ou negar a sua participação a qualquer momento.

Caso você precise de atendimento médico durante o estudo, você pode contactar um dos seguintes Médicos pelo telefone (79) 2105-1806: Dra. Amélia Ribeiro de Jesus ou Dr. Roque Almeida. Caso você queira saber alguma coisa sobre seus direitos e de seu filho, como paciente, você pode procurar o Comitê de Ética do Hospital Universitário (79) 3194-7208.

Caso deseje contatar o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da UFS, seguem as informações abaixo. Este é o órgão que cuida dos seus direitos e conversa com os cientistas para assegurar que tudo correrá da melhor forma.

- Rua Cláudio Batista S/N- Centro de pesquisas Biomédicas -Bairro Sanatório, CEP: 49060-100 Aracaju -SE
- Fone:(79) 3194-7208
- e-mail: cephu@ufs.br

Se você leu o consentimento informado ou este lhe foi explicado e você concorda em participar do estudo, favor assinar o nome abaixo. Este documento possui duas vias, uma delas ficará com você para guardar e todas as páginas devem ser rubricadas, por favor.

_____	_____	_____
Assinatura do participante	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura do pesquisador	Data	Hora
_____	_____	_____
Assinatura da testemunha	Data	Hora

## APÊNDICE D –



## QUESTIONÁRIO SARS-CoV-2 / COVID-19

Nº Estudo: 

**Nome do Projeto:** Estudo clínico-epidemiológico e geográfico, imunológico e genético da infecção pelo SARS-CoV-2 em Sergipe.

**Nome do Paciente:** \_\_\_\_\_

Data de nascimento: \_\_\_\_\_ CPF: \_\_\_\_\_

Endereço: \_\_\_\_\_

Município: \_\_\_\_\_ Idade: \_\_\_\_\_ Sexo: \_\_\_\_\_ Peso: \_\_\_\_\_

Altura \_\_\_\_\_ Telefone: \_\_\_\_\_ Registro: \_\_\_\_\_

**Data da coleta e aplicação deste questionário:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## DADOS CLÍNICOS GERAIS

Você teve COVID-19 quantas vezes? ( ) Não teve COVID-19 ( ) 1x ( ) 2x ( ) mais de 2x

SINTOMAS (1º episódio)	PRESENTE	AUSENTE	DURAÇÃO DOS SINTOMAS (DIAS)
Febre			
Tosse			
Coriza			
Dor de garganta			
Dificuldade de respirar			
Diarreia			
Náusea/ vômito			
Alteração no paladar			
Alteração no olfato			

**Outros sintomas / observações:** \_\_\_\_\_

**Data de início dos sintomas:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Tomou algum medicamento para os sintomas?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, quais medicamentos?

\_\_\_\_\_

SINTOMAS (2º episódio)	PRESENTE	AUSENTE	DURAÇÃO DOS SINTOMAS (DIAS)
Febre			
Tosse			
Coriza			
Dor de garganta			
Dificuldade de respirar			
Diarreia			
Náusea/ vômito			
Alteração no paladar			
Alteração no olfato			

**Outros sintomas / observações:** \_\_\_\_\_

**Data de início dos sintomas:** \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

**Tomou algum medicamento para os sintomas?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, quais medicamentos?

\_\_\_\_\_

## ATENDIMENTO MÉDICO

### 1º EPISÓDIO

**Foi para UBS?** ( ) SIM ( ) NÃO

**Foi para Urgência?** ( ) SIM ( ) NÃO

**Foi Internado?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, qual o tempo de internamento? \_\_\_\_\_ Onde?

\_\_\_\_\_

Desfecho:

\_\_\_\_\_

### 2º EPISÓDIO

**Foi para UBS?** ( ) SIM ( ) NÃO

**Foi para Urgência?** ( ) SIM ( ) NÃO

**Foi Internado?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, qual o tempo de internamento? \_\_\_\_\_ Onde?

\_\_\_\_\_

Desfecho:

\_\_\_\_\_

## DIAGNÓSTICO DE INFECÇÃO POR SARS-CoV-2

### 1º EPISÓDIO

**Teste realizado para SARS-CoV-2:**

( ) QPCR Resultado: \_\_\_\_\_ Local \_\_\_\_\_ Data de realização:

( ) Teste rápido Resultado: \_\_\_\_\_ Local \_\_\_\_\_ Data de realização:

( ) Outro teste \_\_\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_ Local \_\_\_\_\_ Data de realização:

Observações:

\_\_\_\_\_

\_\_\_\_\_

**2º EPISÓDIO****Teste realizado para SARS-CoV-2:**

- ( ) QPCR Resultado: \_\_\_\_\_ Local \_\_\_\_\_ Data de realização: \_\_\_\_\_  
 ( ) Teste rápido Resultado: \_\_\_\_\_ Local \_\_\_\_\_ Data de realização: \_\_\_\_\_  
 ( ) Outro teste \_\_\_\_\_ Resultado: \_\_\_\_\_ Local \_\_\_\_\_ Data de realização: \_\_\_\_\_

Observações: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**4. CARACTERÍSTICAS**

**Tipo sanguíneo:** A<sup>+</sup> ( ) B<sup>+</sup> ( ) AB<sup>+</sup> ( ) O<sup>+</sup> ( )  
 A<sup>-</sup> ( ) B<sup>-</sup> ( ) AB<sup>-</sup> ( ) O<sup>-</sup> ( ) Não soube informar ( )

**Apresenta alguma comorbidade?** ( ) SIM ( ) NÃO

Caso sim, descreva: \_\_\_\_\_

**Faz uso contínuo de algum medicamento?** ( ) SIM ( ) NÃO

Caso sim, descreva: \_\_\_\_\_  
 \_\_\_\_\_

**Usou algum medicamento na última semana antes da coleta?** ( ) SIM ( ) NÃO

Caso sim, quais medicamentos e por quanto tempo?

- ( ) Anticoncepcional ( ) Anti-histamínico ( ) Anti-inflamatório ( ) Analgésico  
 ( ) Antitêrmico ( ) Anti-hipertensivo ( ) Antidiabéticos orais ( ) Outros

Especifique: \_\_\_\_\_

**Tem alguma alergia?** ( ) SIM ( ) NÃO

- ( ) Dermatite ( ) Urticária ( ) Asma ( ) Rinite

Caso outros,

especifique: \_\_\_\_\_

**Apresenta alergias a medicamentos?** ( ) SIM ( ) NÃO

Caso sim, quais?  
 \_\_\_\_\_

**Vacinou para gripe em 2019:** ( ) SIM ( ) NÃO

**Vacinou para gripe em 2020:** ( ) SIM ( ) NÃO

**Alguém da família teve diagnóstico de COVID-19:** ( ) SIM ( ) NÃO

Quem? \_\_\_\_\_

Você teve contato com essa pessoa? ( ) SIM ( ) NÃO  
 \_\_\_\_\_

Moram na mesma casa: ( ) SIM ( ) NÃO

**Alguém que visitou com suspeita ou COVID-19:** ( ) SIM ( ) NÃO

**Você viajou nos últimos 4 meses?** ( ) SIM ( ) NÃO

**Você pratica atividade física?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, com que frequência?

- ( ) todos os dias ( ) até 3 vezes por semana ( ) mais de 3 vezes por semana

Qual a duração do seu exercício por dia?

- ( ) 30 min. ( ) Entre 30 min e 1h ( ) mais que 1h

**Você fuma?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, com que frequência?

( ) todos os dias ( ) 1 ou 2 vezes por semana ( ) 1 ou 2 vezes no mês

**Você ingere bebida alcoólica?** ( ) SIM ( ) NÃO

Se sim, com que frequência?

( ) todos os dias ( ) 1 ou 2 vezes na semana ( ) 1 ou 2 vezes no mês ( ) 1 ou 2 vezes em 2 meses

( ) de vez em quando – socialmente em comemorações, por exemplo.

## **VACINAÇÃO CONTRA SARS-CoV-2**

**Qual vacina você tomou? Em que data? Em qual posto de vacinação?**

**1ª dose:**

**Vacina:**

**Data de aplicação:**

**Local:**

**2ª dose:**

**Vacina**

**Data de aplicação:**

**Local:**

**Você teve reação à vacina?**

**1ª dose** ( ) SIM ( ) NÃO

**Se sim, qual reação?**

---

**A reação ocorreu quanto tempo após a vacinação?**

**2ª dose** ( ) SIM ( ) NÃO

**Se sim, qual reação?**

---

**A reação ocorreu quanto tempo após a vacinação?**