Universidade Federal do Maranhão
Centro de Ciências Biológicas e da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde
Doutorado

RELAÇÃO MATERNO-INFANTIL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E O DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA

EDER MAGALHÃES SILVA FIALHO

São Luís
2022

EDER MAGALHÃES SILVA FIALHO

RELAÇÃO MATERNO-INFANTIL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E O DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Orientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira.
Co-orientadora: Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento.

São Luís
2022

FIALHO, EDER MAGALHÃES.
Relação Materno-Infantil na Resposta Imunológica e o Desenvolvimento da Síndrome da Zika Congênita / EDER MAGALHÃES FIALHO. - 2022.
100 p.

Coorientador(a): Flávia Raquel Fernandes Nascimento.
Orientador(a): Paulo Vitor Soeiro Pereira.
Tese (Doutorado) - Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde/ccbs, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, 2022.

1. IL-17. 2. Monócito. 3. Resposta redox. 4. Virus. I. Nascimento, Flávia Raquel Fernandes. II. Pereira, Paulo Vitor Soeiro. III. Título.

EDER MAGALHÃES SILVA FIALHO

RELAÇÃO MATERNO-INFANTIL NA RESPOSTA IMUNOLÓGICA E O DESENVOLVIMENTO DA SÍNDROME DA ZIKA CONGÊNITA.

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde da Universidade Federal do Maranhão, como requisito parcial para obtenção do título de Doutor em Ciências da Saúde.

Aprovada em / /

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Paulo Vítor Pereira Soeiro (Orientador)
Universidade Federal do Maranhão

1º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

2º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

3º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

4º Examinador (nome)
Instituição do Examinador

Deus não é homem para que minta, nem filho do homem
para que se arrependa. Acaso ele fala, e deixa de agir?
Acaso promete, e deixa de cumprir?

Números 23:19

E ao olhar pra trás, tudo que passou

Venho agradecer quem comigo estava

Ergo minhas mãos pra reconhecer

E hoje eu sou quem eu sou

Pois Sua mão me acompanhava

Mas eu sei, não é o fim, é só o começo da jornada

Eu abro o meu coração pra minha nova história

Pedro Valença

Dedico esse trabalho

à Alessandra, Elisa e Miguel.

AGRADECIMENTOS

Há dez anos eu faço a mesma oração, pedindo a Deus que me ajudasse no término do doutorado, e agora, finalmente posso desfrutar do gozo de ter minhas orações atendidas. Hoje eu só quero agradecer por todo aprendizado que esse tempo me proporcionou, por tudo aquilo em que cresci e me desenvolvi. Obrigado Deus, por ter caminhado comigo toda essa trajetória e me ajudado a enxergar que a tua vontade é boa, agradável e perfeita.

Agradeço...

À minha mãe que sempre me incentivou nos meus estudos, e quando eu pensei que não fosse possível, ela me impulsionou a ir avante.

À minha esposa Alessandra por ser uma comigo na realização desse sonho. Choramos e rimos várias vezes, ficamos desempregados, tivemos dois filhos, e sempre senti seu apoio em tudo. Obrigado pela amizade, pelo companheirismo, pelo cuidado, pelos dengos... e pela paciência comigo durante todo esse tempo.

À minha filha Elisa, por entender quando eu não podia brincar para me dedicar aos estudos.

Ao grupo de pesquisa do departamento de Saúde Coletiva, na pessoa do Prof Antônio Augusto, por me conceder a oportunidade de trabalhar no projeto Zika. Assim como, agradecer a cada mãe e criança que participaram do projeto.

Ao meu orientador Paulo Vítor que sempre com muita paciência e otimismo conseguia resolver as situações. Aprendi muito além da pesquisa com você, como por exemplo, que muita coisa se resolve com fita crepe.

Ao Grupo de Pesquisa de Imunologia Humana (GPIH), Lais, Kelly, Marlla, Rafisa, Raissa, mas principalmente a Lílian, minha companheira das madrugadas. Obrigado pela amizade e parceria.

Ao LIF, onde não me arrisco a citar nomes pois somos muitos, mas onde sempre podemos encontrar amparo quando precisamos.

À Profa Flávia Nascimento, que me acompanha desde a iniciação científica, obrigado pela alegria de tê-la nessa etapa final.

À Profa Rosane, uma fonte de inspiração, que durante suas disciplinas trouxe o estímulo necessário para me fazer seguir em frente.

À Profa Lucilene, que acompanha o processo há dez anos e sempre pude contar com sua amizade.

Aos alunos Emanoel e Carol, dois presentes que mais me ajudaram, do que eu a eles.

Ao LPI, e aqui eu me arrisco a nomear os meus amigos que dividiram esse tempo com muita alegria, e também, com cafezinhos e lanchinhos da tarde. Jefferson, Douglas, Andressa, Luana, Sônia, Liana. Obrigado por caminharem comigo.

Ao nosso vizinho LIAC, obrigado pela parceria tão agradável. Profa Ana Paula, Sulayne, André, Mirtes e Elis. Muito obrigado pelos socorros bem presentes.

Aos órgãos de fomento FAPEMA, CAPES, CNPq por prover condições de desenvolver a pesquisa, e em particular, ao CNPq pela conceção da bolsa de apoio técnico.

Muito difícil determinar a escala temporal para estender meus agradecimentos. Por isso, gostaria de finalizar dizendo que recebi ajuda de muitas mãos para chegar até aqui, e sou grato a cada uma delas.

Obrigado!

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO 17
2. REFERENCIAL TEÓRICO 18
2.1 Biologia do Vírus Zika 18
2.2 Epidemiologia 19
2.3 O surto de microcefalias. 22
2.4 As complicações sobre o sistema nervoso 24
2.5 A Síndrome da Zika Congênita no Maranhão 28
2.6 Imunopatogênesis 29
3. OBJETIVOS 33
Objetivo Geral 33
Objetivos específicos 33
4. MATERIAL E MÉTODOS 34
4.1. Desenho do estudo 34
4.2 Aspectos éticos 36
4.3 PRNT 36
4.4 Imunofenotipagem 36
4.5 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio 37
4.6 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA – citometryc bead array) 37
4.7 Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD) 38
4.8 Dosagem de Arginase 38
4.9 Dosagem de Óxido Nítrico pelo plasma 39
4.10 Análise estatística 39
5. RESULTADOS 41
5.1. Caracterização dos pacientes 41
5.2. Caracterização do perfil imunológico 42
5.2.1 Perfil imunofenotípico de crianças SZC+ e suas mães. 42
5.2.2 Avaliação do perfil de citocinas na SZC. 49
5.2.3 Avaliação da expressão da molécula HLA em monócitos. 52
5.3 Avaliação do estresse oxidativo 53
5.4 Associação dos aspectos clínicos da SZC com o perfil imune-inflamatório 58
5.4.1 Associação dos aspectos clínicos com as populações de células e os níveis citocinas. 58

5.4.2 Associação dos aspectos clínicos com o estresse oxidativo. 63
6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO 68
7. CONSIDERAÇÕES FINAIS 78
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 79

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CDC	*Center for Disease Control and Prevention*
DHR	*Dihydrorhodamine*
DMEM	*Dulbecco's Modified Eagle Medium* (Meio Dulbecco)
EDTA	Etilenodiamino tetraacético
EROS	Espécies reativas de oxigênio
ESPII	Emergência em Saúde Púbica de Importância Internacional.
ESPIN	Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional.
FBS	*Fetal Bovine Serum* (Soro Fetal Bovino)
FSC	*Forward Scatter*
HLA	*Human Leukocyte Antigen* (Antígeno leucocitário humano)
IFN	Interferon
IL	Interleucina
MPO	Mieloperoxidase
MFI	Média da intensidade de fluorescência
NINAR	Centro de Referência em Neurodesenvolvimento, Assistência e Reabilitação de Crianças
PE	*Phycoeritrina* (Ficoeritrina)
PFU	*Plaque-Forming Unit* (Unidade formadora de placa)
PMA	*Phorbol 12-myristate 13-acetate*
PRNT	*Plaque-reduction neutralization testing*
ARN	Ácido Ribonucléico.
RT-PCR	Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa
SOD	Superóxido dismutase
SSC	*Side Scatter*
SZC	Síndrome da Zika Congênita
TNF	*Tumor Necrosis Factor* (Fator de Necrose Tumoral)
TAM	*T-cell immunoglobulin and mucin domain protein*
TIM	*Tyro3, Axl, and Mer*
TORCH	Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus e Herpes.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1 Manifestações clínicas durante o período gestacional.

TABELA 2 Fenótipo da Síndrome da Zika Congênita.)

TABELA 3 Tomografia computadorizada

TABELA 4 Dados Antropométricos

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1 Estrutura do vírion e sua poliproteína sintetizada a partir de sua molécula de RNA fita simples positiva.

FIGURA 2 Mecanismos de internalização do Zika vírus.

FIGURA 3 Linha do tempo dos surtos envolvendo o vírus Zika

FIGURA 4 Ciclo de transmissão do vírus de Zika através do vetor artrópode no ambiente silvestre e no ambiente urbano

FIGURA 5 Figura 5. Aspectos clínicos associados a Síndrome da Zika Congênita

FIGURA 6 Desenho do estudo

FIGURA 7 Caracterização fenotípica dos leucócitos de sangue periférico em crianças com SZC e suas mães.

FIGURA 8 Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T em crianças com SZC e de suas respectivas mães.

FIGURA 9 Correlação entre as populações de leucócitos das crianças PRNT+ e de suas mães.

FIGURA 10 Correlação entre as populações de leucócitos das crianças PRNT- e de suas mães.

FIGURA 11 Correlação entre as populações de leucócitos das crianças SZC- e de

FIGURA 12 suas mães

Níveis de citocinas plasmáticas das crianças com SZC.

FIGURA 13 Níveis de citocinas plasmáticas das mães das crianças SZC -, PRNT- e PRNT+.

FIGURA 14 Média da intensidade de fluorescência da molécula HLA na

FIGURA 15 superfície de monócitos do sangue periférico.

FIGURA 16 Avaliação da resposta oxidativa das crianças com SZC.

FIGURA 17 Avaliação da resposta oxidativa das mães de crianças com SZC.

FIGURA 18 Avaliação da resposta redox na SZC.

Avaliação da produção de óxido nítrico na SZC.

FIGURA 19 Caracterização fenotípica dos leucócitos de sangue periférico em crianças com síndrome congênita e suas mães.

FIGURA 20

FIGURA 21 Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T em crianças com síndrome congênita e de suas respectivas mães.

FIGURA 22 Níveis de citocinas plasmáticas das crianças com síndrome congênita.

FIGURA 23 Níveis de citocinas plasmáticas das mães de crianças com síndrome congênita.

FIGURA 24 Avaliação da resposta oxidativa das crianças com síndrome congênita e suas mães.

FIGURA 25 Análise pareada entre a produção espontânea (ESP) e estimulada (EST) de peróxido de hidrogênio em monócitos.

FIGURA 26 Análise pareada entre a produção espontânea (ESP) e estimulada (EST) de peróxido de hidrogênio em neutrófilos

FIGURA 27 Avaliação do delta da produção de peróxido de hidrogênio.

Avaliação do delta da produção de peróxido de hidrogênio

RESUMO

O Zika vírus é um arbovírus que ganhou grande importância na saúde pública, pois a infecção materna por esse vírus durante a gestação pode ser responsável pelo desenvolvimento de uma série de malformações fetais, chamadas de Síndrome da Zika Congênita (SZC). Os processos patológicos envolvidos no desenvolvimento da SZC ainda não foram bem estabelecidos, mas sabe-se que há um papel importante de mecanismos imunológicos na susceptibilidade e evolução da síndrome. Por isso, nosso estudo correlacionou o perfil imunológico das crianças sindrômicas com o de suas respectivas mães, bem como os marcadores da resposta oxidativa de ambos Participaram do estudo crianças que apresentaram o fenótipo clínico da SZC no nascimento, diagnosticado a partir dos exames de imagens, onde avaliamos a presença de calcificações, redução do volume do parênquima, ventriculomegalia e malformações corticais. As manifestações clínicas foram classificadas em leve, moderada e grave. Para o estudo foram coletadas amostras de sangue de crianças com SZC, confirmada por meio do Teste de Neutralização de Redução de Placas (PRNT), e de suas mães, bem como de crianças que não desenvolveram síndrome e foram negativas para o teste de neutralização, e de suas mães. Ambos os grupos de mães apresentaram sinais e sintomas sugestivos da febre da Zika durante a gestação. Como critério de positividade utilizamos o PRNT50, ou seja, a amostra que inibiu a formação de 50% das placas na diluição $\geq$1:10. A partir das amostras de sangue foram feitas a imunofenotipagem dos leucócitos sanguíneos; a dosagem de citocinas e a avaliação de parâmetros da resposta redox. Observamos que o perfil de resposta imunológica entre mães e filhos PRNT+ está correlacionado, pois ambos apresentaram aumento de interleucina (IL) -17 e de monócitos, que provavelmente possuem um fenótipo M1, devido ao aumento da resposta oxidativa e diminuição da atividade da enzima arginase plasmática. Além de exibir um perfil inflamatório, mães e filhos apresentaram diminuição da subpopulação de linfócito T CD4 e, somente as mães, apresentaram redução na expressão de moléculas de HLA-DR classe II. Foi observado também que crianças que apresentaram maior gravidade clínica exibiam um aumento nas concentrações de IL-17, assim como, suas mães apresentavam maiores concentrações de IL-17 e IL-6. Os resultados permitem inferir que o desenvolvimento da SZC e a maior gravidade das malformações causadas pela infecção intrauterina pelo Zika vírus, estão relacionadas à ativação do perfil Th17 na resposta imune materna, devido ao aumento na produção de citocinas e outros mediadores inflamatórios.

Palavras-chave: monócitos, resposta redox, IL-17, Zika vírus, HLA-DR.

ABSTRACT

Zika virus is an arbovirus that has gained great importance in public health because maternal infection by this virus during pregnancy is responsible for development of a series of fetal malformations, called Congenital Zika Syndrome (CZS). The pathological processes involved in the development of CZS have not yet been well established, but it is known that there is an important role of immune mechanisms in susceptibility and evolution of the syndrome. Children who presented the clinical phenotype of CZS at birth participated in the study. Based on the imaging exams, where the presence of calcifications, reduced parenchymal volume, ventriculomegaly and cortical malformations were evaluated, the clinical manifestations were classified as mild, moderate and severe. Thus, the study correlated the immunological profile of the syndromic children with that of their respective mothers, as well as the oxidative response markers of both. For this purpose, blood samples were collected from children with CZS, confirmed by means of the Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT), and from their mothers, as well as from children who did not develop the syndrome and were negative for the neutralization test, and from their mothers. From the blood samples, immunophenotyping of blood leukocytes, dosage of cytokines and evaluation of redox response parameters were performed. We observed that the immune response profile between mothers and PRNT+ children is correlated, both have increased interleukin (IL)-17 and monocytes, which probably have an M1 phenotype, due to increased oxidative response, which was perceived by increased production of hydrogen peroxide, and also due to decreased activity of plasma arginase enzyme. In addition to the increased inflammatory profile, mothers and children showed a decrease in the CD4 T lymphocyte subpopulation and, specifically, mothers had a decrease in the expression of HLA molecules on the surface of monocytes. Thus, we can notice a reduction in regulatory mechanisms, contributing to the establishment of a more inflammatory response. It was also observed that children with greater clinical severity showed increased concentrations of IL-17, as well as their mothers showed higher concentrations of IL-17 and IL-6. Through these results we can suggest that the development of SZC may be related to an immune-inflammatory profile characterized by both an increase in inflammatory components and a reduction in regulatory mechanisms. And probably, the greater severity of malformations caused by intrauterine infection by Zika virus may be related to maternal immune activation induced by Th17 response profile.

Keywords: monocyte, redox response, IL-17, virus

1. INTRODUÇÃO

Durante os anos de 2014 e 2016 o mundo enfrentou um surto provocado pelo aumento do número de casos de microcefalia em diferentes regiões do globo, mas seus efeitos foram mais expressivos no Brasil, principalmente na região Nordeste. Em pouco tempo foi constatado que o vírus Zika era o principal agente etiológico dos casos de microcefalia e de outras malformações congênitas, pois, além de ser transmitido verticalmente da mãe para o feto, o vírus possui também tropismo pelas células nervosas do concepto. Atualmente, o número de casos registrados da doença caiu drasticamente, entretanto, os casos de microcefalia e as complicações neurológicas ainda causam grande impacto, nas crianças afetadas, nos pais, e no sistema público de saúde (França et al. 2018).

A infecção pelo vírus Zika provoca uma doença autolimitante, tendo como principais sintomas o *rash* maculopapular e dor. As principais manifestações relatadas de dor são: cefaleia, dor retro orbital, mialgia e dores nas articulações, incluindo mãos, pulso, cotovelos, tornozelos e joelho (ZANLUCA *et al.*, 2015). Apesar da infecção pelo vírus Zika ser considerada benigna e não estar associada à mortalidade, muitas pessoas acometidas pela doença apresentaram complicações no sistema nervoso após o desaparecimento dos sintomas, sendo a síndrome de Guillain-Barré a desordem neurológica mais comumente diagnostica no período pós infecção, com sua relação de causa-efeito já comprovada (MILLER *et al.*, 2017; WEAVER *et al.*, 2016). Outra complicação é o retardo do neurodesenvolvimento de fetos de gestantes que tiveram infecção no pré-natal, cuja a principal consequência registrada é a microcefalia (SANTOS; GOLDENBERG, 2016; SARNO *et al.*, 2016).

Nesse contexto, estudos recentes demonstraram que o vírus Zika induz uma resposta imune-inflamatória mais robusta do que outros vírus que também causam danos ao sistema nervoso. Dessa forma, é provável que o princípio das desordens neurológicas tenha como base a resposta imunológica do hospedeiro, que devido a sua plasticidade pode resultar em resistência ou susceptibilidade a infecção.

Diante disso, nosso estudo se propôs a investigar a relação do perfil imunológico de mães infectadas durante a gestação e de seus bebês, buscado auxiliar na elaboração de novas estratégias de tratamento e de remediação dos efeitos teratogênicos do vírus Zika, assim como também auxiliar na prevenção do surgimento de novos surtos no mundo

2. REFERENCIAL TEÓRICO

2.1 Biologia do Vírus Zika

O vírus Zika pertence ao gênero *Flavivírus* e à família Flaviviridae, a qual engloba outros vírus de importância para saúde pública, como o vírus da dengue, da febre amarela, da encefalite japonesa, da encefalite do carrapato e o vírus da febre do Nilo (Gould; Solomon, 2008). Trata-se de um arbovírus transmitido pela picada do mosquito do gênero *Aedes*, cuja estrutura é formada por um envelope, uma membrana, um capsídeo, e uma molécula de RNA fita simples positiva, ou seja, capaz de ser traduzida de forma semelhante ao RNA mensageiro, sendo processado imediatamente após a infecção da célula hospedeira (Figura 1). A sequência de nucleotídeos do RNA genômico possui duas regiões não codificantes e uma região que codifica uma poliproteína formada por 3 proteínas estruturais (C, prM, E) e 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5) (KUNO *et al.*, 1998)

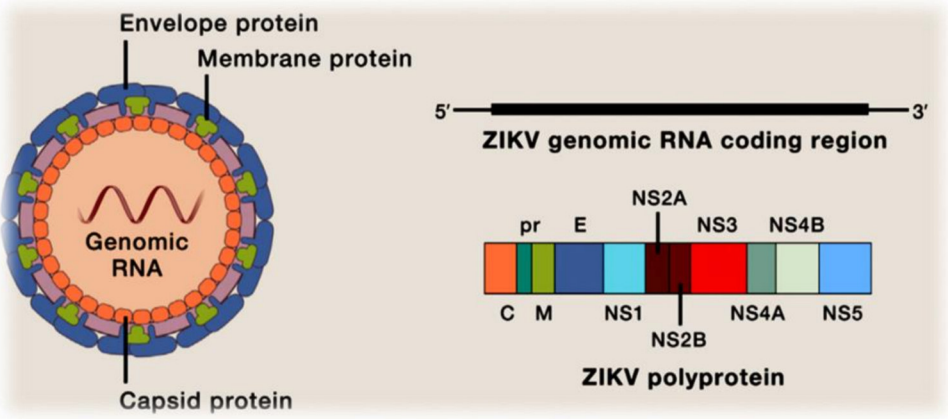


Figura 1. Estrutura do vírion e sua poliproteína sintetizada a partir de sua molécula de RNA fita simples positiva (Olagnier et al 2016).

Inicialmente, os vírus precisam entrar na célula hospedeira para realizar o metabolismo do seu ácido nucléico e, para isso, os vírus possuem fatores de adesão que se ligam a receptores presentes na superfície da membrana plasmática da célula possibilitando sua ancoragem e posterior internalização (LÓPEZ-GARCÍA; MOREIRA, 2012).

O processo de ancoragem do vírus Zika é intermediado pela glicoproteína E, presente no envelope viral, e pelos receptores Tipo-C de lectina ou pelos receptores da família TIM (*T-cell immunoglobulin and mucin domain protein*) e TAM (*Tyro3, Axl, and*

Mer), presentes na superfície das células alvo (AGRELLI *et al.*, 2019) (Figura 2). Para o processo de internalização, o vírus usa a via endocítica mediada pela clatrina, a qual, aparentemente, é similar entre os diferentes tipos de células que o vírus infecta (OWCZAREK *et al.*, 2019). Considerando que a principal forma de transmissão é o inóculo do vírus na pele, por meio da picada dos mosquitos do gênero *Aedes*, as primeiras células a serem infectadas são os queratinócitos, as células dendríticas e os fibroblastos presentes na epiderme e derme (HAMEL *et al.*, 2015).

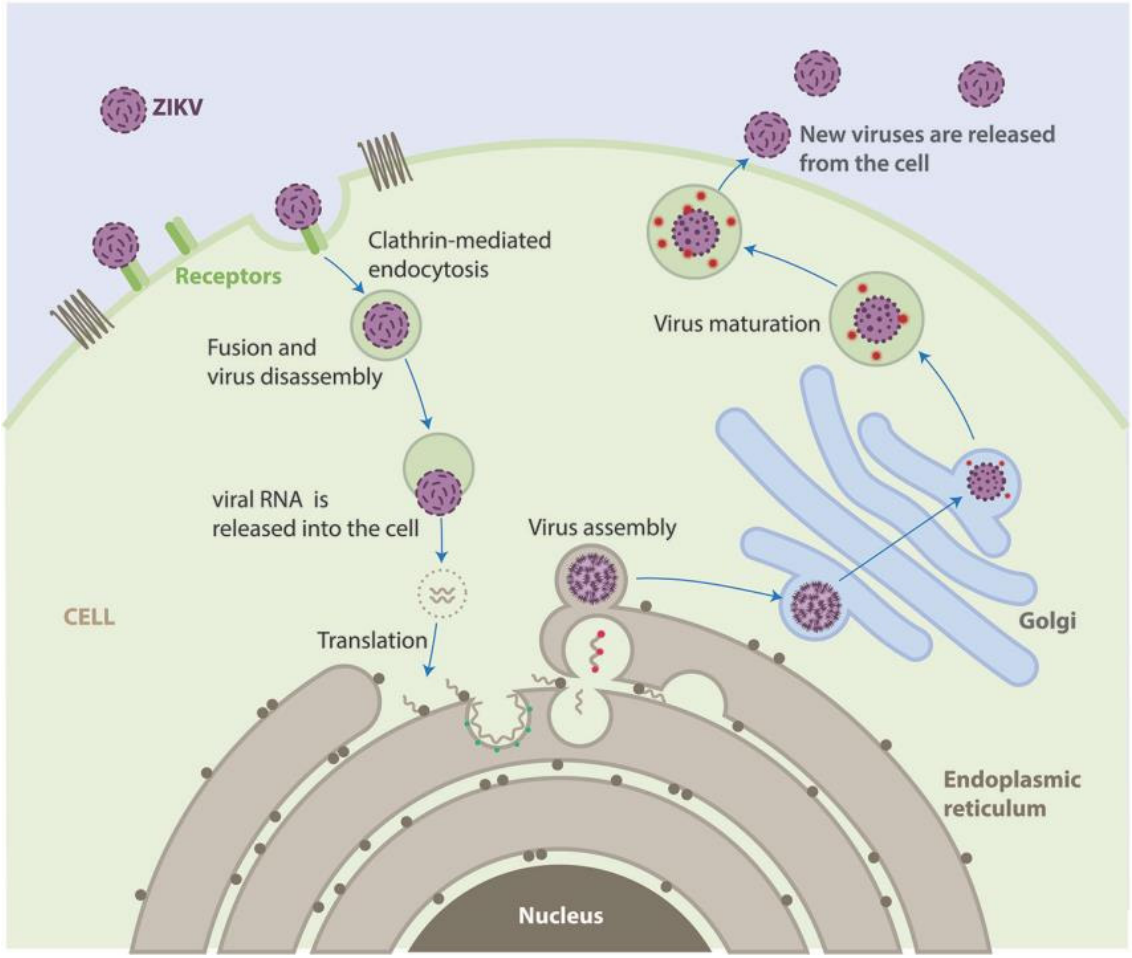


Figura 2. Mecanismos de internalização do Zika vírus (ACOSTA-AMPUDIA *et al.*, 2018)

2.2 Epidemiologia

O primeiro registro do vírus Zika aconteceu em 1947 na floresta Zika em Uganda, África, quando o vírus foi isolado a partir de amostras obtidas de macacos *Rhesus* sentinelas utilizados em pesquisas para febre amarela (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Após o seu isolamento, durante aproximadamente 60 anos, o vírus teve sua

distribuição restrita aos continentes africano e asiático, com relatos esporádicos sobre infecções em humanos (WAGGONER; PINSKY, 2016) (Figura 3).

No continente africano as primeiras evidências que o vírus Zika teria relação com a espécie humana foram obtidas de inquéritos sorológicos realizados em Uganda, os quais mostraram que 6,1% dos residentes possuíam imunidade contra o vírus Zika (DICK, 1952a). Outras regiões da África e da Ásia também apresentaram prevalência de anticorpos neutralizantes, como as regiões da África Oriental, Índia e Filipinas (Smithburn 1952; 1954; Hammon, Schrack, and Sather 1958). Entretanto, o primeiro caso de doença febril só foi registrado na Nigéria, durante um surto de icterícia em 1953 (MACNAMARA, 1954). Nos 54 anos seguintes, foram registrados apenas 13 casos de febre da Zika, todos localizados nos continentes africano e asiático (PETERSEN *et al.*, 2016).

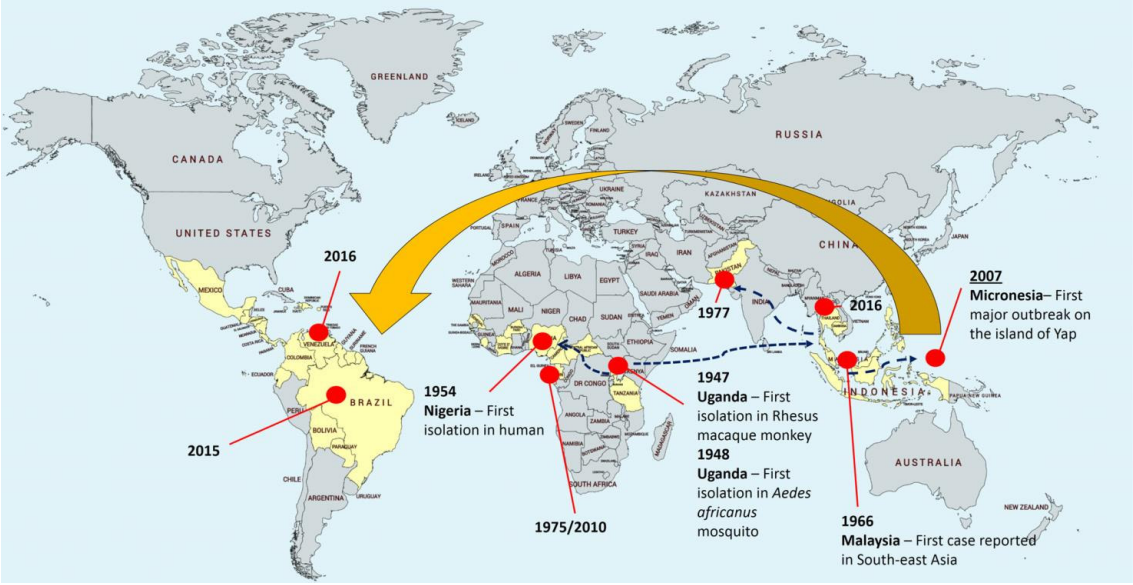


Figura 3. Linha do tempo dos surtos envolvendo o vírus Zika (THAM *et al.*, 2018)

Em 2007, aconteceu um surto de uma doença febril exantemática na Ilha Yap do Estado da Micronésia que foi confundida inicialmente com Dengue, mas confirmada posteriormente ser causada pelo vírus Zika, por técnicas moleculares, pois os testes sorológicos apresentavam reação cruzada de anticorpos para outras arboviroses (LANCIOTTI *et al.*, 2008). Duffy et al. (2009) chamaram a atenção para a emergência da expansão da transmissão do vírus Zika, depois de terem relatado o surto que aconteceu em 2007, na Micronesia. De acordo com os autores, 73% da população da ilha de Yap foi infectada, e embora a maioria dos pacientes manifestasse uma doença moderada, o episódio deveria ser considerado como risco para saúde pública.

Ainda no continente da Oceania, em 2013 aconteceu outro surto, agora na Polinésia Francesa, onde foram registrados 19.000 casos suspeitos para Zika (CAO-LORMEAU, Van-Mai *et al.*, 2014). Outros surtos subsequentes aconteceram em outras ilhas do Pacífico, como Nova Caledônia (2014), Ilha da Páscoa (2014), Ilhas Cook (2014), Samoa (2015) e Samoa Americana (2016) (DERRAIK; SLANEY, 2015).

No Brasil, os primeiros casos foram registrados no início de 2015 na cidade de Camaçari, Bahia. Foram coletadas amostras do soro de 24 pacientes que relataram apresentar *rash* maculopapular, artralgia, cefaleia e conjuntivite. Foi utilizada a técnica da Reação em Cadeia da Polimerase Transcriptase Reversa (RT-PCR) para detectar o material genético do vírus da Dengue, vírus da Chikungunya, do vírus da febre do Nilo, vírus Mayaro e do vírus Zika. Entre as 24 amostras, 7 foram positivas para o vírus Zika (CAMPOS; BANDEIRA; SARDI, 2015). A partir desse momento, surgiram notificações em vários Estados do nordeste brasileiro, como Maranhão, Rio Grande do Norte, Paraíba, sendo que, no dia 15 de maio de 2015, confirmou-se a autoctonia do vírus Zika no Brasil (FANTINATO *et al.*, 2016).

Em todos os episódios de epidemias provocados pelo vírus Zika, a transmissão acontecia pela picada dos mosquitos *Aedes aegypti*, *Aedes albopictus*, *Aedes hensilli* e *Aedes polynesiensis,* dependendo da distribuição geográfica do vetor (Figura 4). Todavia, outras formas de transmissão foram registradas nos últimos anos: a via sexual, por meio de transfusão de sangue e pela via perinatal. O intercurso sexual foi primeiramente observado em um paciente, que contraiu a Zika na África, retornou para casa e após 9 dias seu cônjuge começou a apresentar sintomas da Zika. Visto que a região não apresentava distribuição para o inseto vetor, o provável mecanismo se deu pela transmissão pessoa-pessoa (FOY *et al.*, 2011). Posteriormente, outros estudos confirmaram a persistência do vírus Zika no sêmen humano até 92 dias após o início dos sintomas, bem como na secreção vaginal (GASKELL *et al.*, 2017). A transmissão por transfusão de sangue foi registrada na Polinésia Francesa, onde amostras de doadores assintomáticos foram positivas para vírus Zika, quando testadas pelo método RT-PCR (MUSSO *et al.*, 2014). Por fim, a via perinatal foi documentada, inicialmente, também na Polinésia Francesa em dois neonatos cujas mães tiveram teste positivo para o vírus (CAUCHEMEZ *et al.*, 2016).

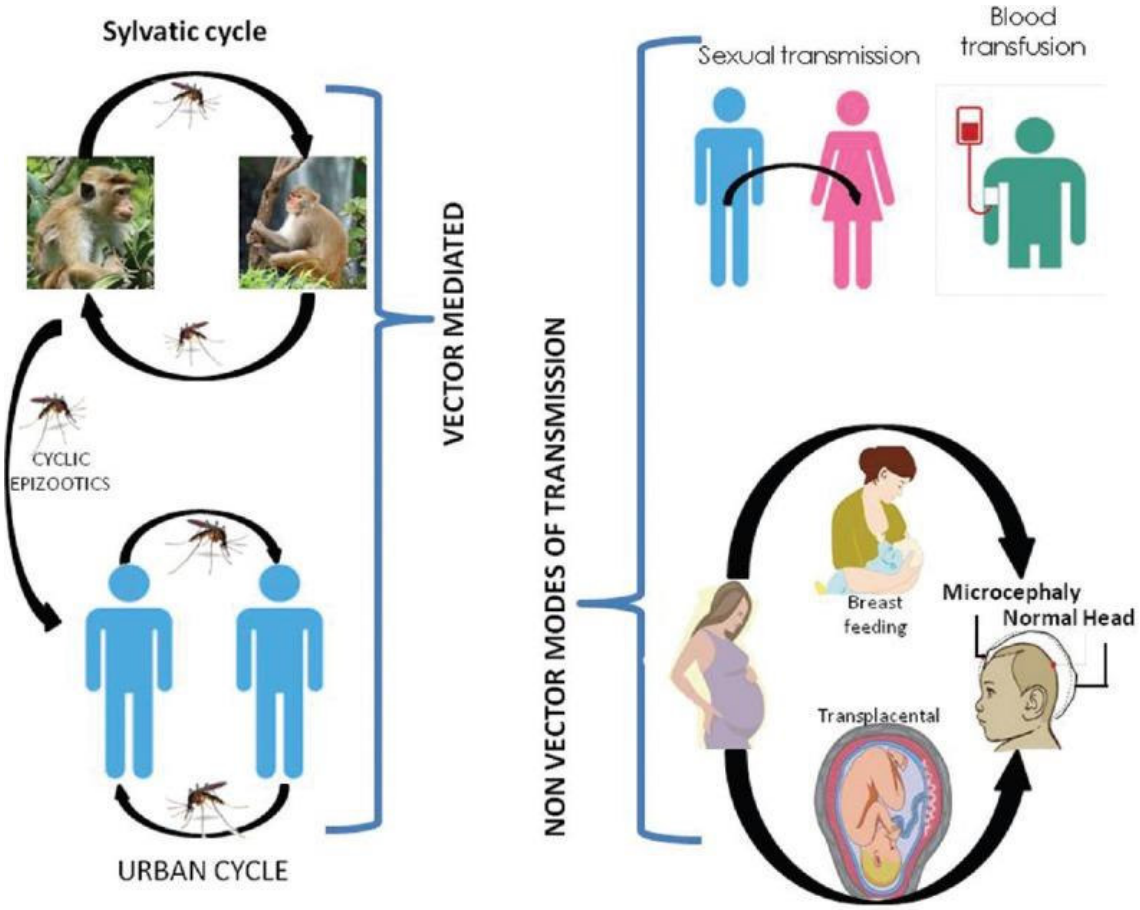


Figura 4. Ciclo de transmissão do vírus de Zika através do vetor artrópode no ambiente silvestre e no ambiente urbano. (MISHRA; BEHERA, 2016)

De fato, grande parte do conhecimento sobre a biologia do Zika vírus foi alcançado após os surtos que aconteceram, primeiro na Oceania, nas ilhas Yap em 2007 e, em seguida, na Polinésia Francesa em 2013, e por último no continente americano em 2014 a 2015.

Apesar do registro de surtos epidêmicos em diferentes regiões do globo, a febre pelo vírus Zika, geralmente, não era associada a complicações graves, sendo em geral uma doença autolimitada. No entanto, em 2015, o vírus Zika tornou-se um problema de saúde pública mundial devido sua associação ao aparecimento de desordens neurológicas, principalmente congênitas (RIBEIRO, *et al.*, 2016). Tais episódios possibilitaram reunir informações epidemiológicas, clínicas, laboratoriais e moleculares sobre o vírus ampliando as estratégias de prevenção e remediação da doença.

2.3 O surto de microcefalias.

O Brasil foi o epicentro dos casos de microcefalias no final do ano de 2015. A primeira notificação ocorreu no Estado de Pernambuco, em 22 de outubro, a qual solicitava apoio para investigar o aparecimento de 26 casos dessa malformação. O aumento na frequência de casos de microcefalia levou o Brasil a declarar em novembro de 2015 Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN). Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial da Saúde declarou Emergência em Saúde Pública de Importância Internacional (ESPII). A ESPII foi encerrada em novembro de 2016 e a ESPIN foi encerrada em maio de 2017(BRASIL, 2020). Para dimensionar o quanto o número de casos aumentou, em 2014 ocorreram menos de 15 registros mensais de no Brasil. Entretanto, esse número aumentou em até 100 vezes, entre novembro de 2015 e fevereiro de 2016.

A maioria dos casos ocorreu na região Nordeste, sendo que o estado de Pernambuco foi o local onde houve o maior número de registros de neonatos com microcefalia, com 1345 casos notificados, seguido da Paraíba (719 casos), Bahia (704 casos) e Rio Grande do Norte (313) (BRASIL, 2018). Apesar do elevado número de notificações, poucos casos foram confirmados, quanto a relação causal entre a infecção materna pelo vírus Zika na gravidez e as alterações congênitas observadas nos bebês. Em média, somente 27% dos casos com essa associação foram confirmados na região Nordeste (França et al. 2018).

Entre os anos de 2015 e 2019 foram notificados 18.282 casos de microcefalia com suspeita de associação com o vírus Zika, sendo que, destes apenas 3474 (19%) foram confirmados (BRASIL, 2019). A confirmação do diagnóstico da infecção pelo vírus Zica é importante, visto que, alterações congênitas são também comuns nas infecções ocasionadas por outros agentes infecciosos, conhecidos pelo acrônimo TORCH (toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus e herpes) (LEVINE *et al.*, 2017). Além disso, no tocante a cidade de São Luís, a microcefalia não é um evento incomum, pois verificou-se que a prevalência de microcefalias no ano de 2010, ou seja, em período anterior ao surto da Zika, a cidade já apresentava número de casos de microcefalia maiores que a prevalência estimada, sendo que alguns dados socioeconômicos foram associados com casos de microcefalias, tais como, baixa escolaridade materna, primiparidade, parto normal, e restrição do crescimento intrauterino (Silva et al. 2018).

Um estudo mapeou a associação entre as áreas com elevada incidência de casos do vírus Zika e o aumento do número de casos de microcefalias, e constatou que as regiões com elevada incidência de microcefalias, eram as mesmas com elevados números de

casos de febre da Zika, em meses anteriores, evidenciando assim a relação entre a infecção materna pelo vírus Zika e as desordens neurológicas congênitas observadas nos seus bebês (VISSOCI *et al.*, 2018)

Atualmente, já está bem estabelecida a relação causal entre a exposição intraútero ao vírus Zika e as desordens neurológicas, pois esse vírus apresenta neurotropismo acentuado, o que pode resultar em alterações corticais e em anomalias do sistema nervoso, apresentando padrões distintos quanto aos defeitos no nascimento e as deficiências no neurodesenvolvimento do feto e do neonato (Noronha et al. 2016).

2.4 As complicações da Zika no sistema nervoso

A primeira indicação que o vírus Zika estava associado às desordens neurológicas ocorreu em novembro de 2013, na Polinésia Francesa, onde três quartos da população contraiu a infecção, durante um surto epidêmico. A evidência surgiu a partir do caso de uma paciente que teve a febre da Zika e apresentou, após 7 dias fraqueza muscular ascendente, sugestiva de Síndrome de Guillain-Barré, o que resultou na sua hospitalização (OEHLER *et al.*, 2014). Com base nesse caso, desenharam um estudo de caso-controle para analisar a presença de anticorpos neutralizantes anti-Zika em 42 pacientes com história clínica e diagnóstico de Síndrome de Guillain-Barré (SGB). Os resultados mostraram que 41 (98%) pacientes apresentaram anticorpos IgM e IgG anti-Zika. (Cao-Lormeau et al. 2016).

A Síndrome de Guillain-Barré é uma doença autoimune caracterizada pela desmielinização do axônio que compromete principalmente o sistema nervoso periférico (WIJDICKS; KLEIN, 2017). Foi relatada uma baixa prevalência para a SGB entre os pacientes com Zika, provavelmente relacionada a escassez de registros e a dificuldade do diagnóstico da Zika (BARBI *et al.*, 2018). Contudo, não podemos ignorar a sua importância para os cuidados de saúde pública, pois pessoas que sofreram SGB associada à infecção do vírus Zika apresentam polineuropatias axonais, e de forma interessante, sem anticorpos anti-gangliosídeos, levando a considerar que a poliproteína do vírus esteja relacionada com a desmielinização e com as neuropatias na SGB (KOIKE, 2018).

O envolvimento neurológico do vírus Zika atingiu maior repercussão com o nascimento de bebês microcefálicos durante os anos de 2015 – 2016, principalmente no Brasil (BRASIL *et al.*, 2016). O isolamento do vírus Zika do cérebro de fetos humanos microcefálicos trouxe evidências que o vírus poderia atravessar a barreira placentária e

infectar células neurais, replicando-se e induzindo danos neurológicos (MLAKAR *et al.*, 2016).

A associação com células nevosas foi demonstrada inicialmente em 1952, quando em estudos experimentais o vírus Zika foi altamente neurotrópico em cérebros de camundongos, revelando degeneração neuronal e infiltrado celular (DICK, 1952b). Algumas complicações neurológicas, tais como, encefalites, meningoencefalites, paralisias, convulsão e comprometimento da audição e da visão, são causadas por infecções de vírus da família Flaviviridae. Porém, nos últimos 50 anos não havia nenhuma evidência para doenças neurológicas em humanos envolvendo o vírus Zika (GORSHKOV *et al.*, 2019)

Diferentes modelos *in vitro* foram aplicados para demonstrar o efeito do vírus Zika nas células nervosas. Estudo com células progenitoras neurais (NPC) forneceu o primeiro indício de que as células nervosas são susceptíveis ao Zika (TANG *et al.*, 2016). A infecção de neuróforos e organóides revelou características semelhantes àquelas presente quando ocorre redução do volume do parênquima na microcefalia (DANG *et al.*, 2016; GARCEZ *et al.*, 2016). Um outro estudo mostrou que o neurotropismo em neonatos resulta em apoptose, redução da proliferação celular e alterações transcricionais de vias que envolvem o ciclo celular, vias apoptóticas e relacionadas a reposta imune (QIAN *et al.*, 2016).

Posteriormente, foi observado que a infecção durante a gravidez provocava outras complicações, que não envolvia apenas a malformação do cérebro. O espectro de manifestações clínicas envolvia acometimento motor, alterações oftalmológicas e malformações corticais, passando a ser denominado de Síndrome da Zika Congênita (SZC) (MELO *et al.*, 2016).

Dessa forma, a SZC é caracterizada pela microcefalia grave com o crânio parcialmente colapsado, córtex cerebrais finos com calcificações subcorticais, cicatrizes maculares e alteração da retina, contraturas congênitas e hipertonia precoce (Figura 5) (MOORE *et al.*, 2017).

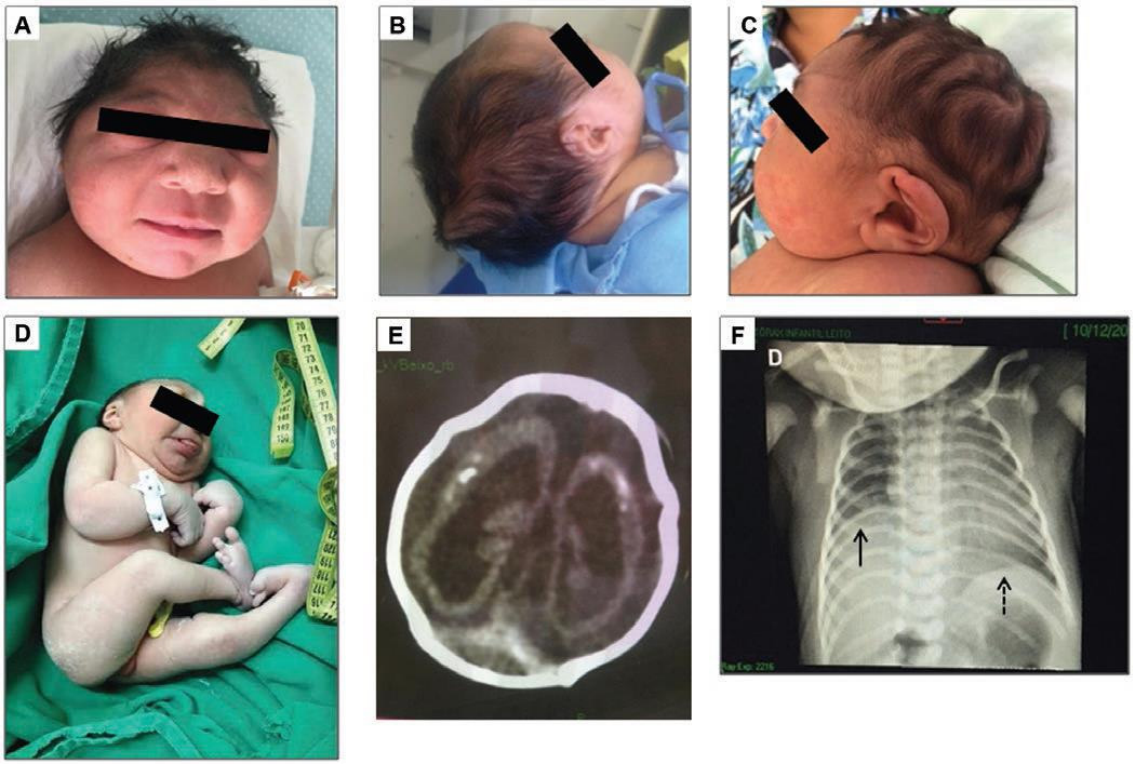


Figura 5. Aspectos clínicos associados a Síndrome da Zika Congênita. (A) Desproporção crânio-facial. (B) Protuberância Occipital. (C) Cavalgaduras da pele do crânio. (D) Artrogriposis. (E) Calcificações subcorticais. (F) Déficit motor, como por exemplo a paralisia do diafragma direito (Moore et al, 2017)

Importante destacar que a microcefalia não representa, necessariamente, um sinal clínico determinante para que haja danos neurológicos, pois muitas crianças que tiveram atraso no desenvolvimento, ou mesmo no neurodesenvolvimento, apresentaram ausência de sinais clínicos ao nascer (RICE *et al.*, 2018). Um estudo onde treze crianças foram acompanhadas, onze desenvolveram microcefalia após 5 meses de idade, além de malformações corticais, diminuição do volume do cérebro, hipoplasia do corpo caloso, ventriculomegalia e calcificações (VAN DER LINDEN *et al.*, 2016). Assim, é possível afirmar que a ausência de microcefalia não exclui a SZC, pois podem ocorrer casos de microcefalia secundária, com manifestação em até um ano após o nascimento (NIELSEN-SAINES *et al.*, 2019).

A microcefalia provocada pelo vírus Zika difere daquela provocada por infecções do acrônimo TORCH, pois além da diminuição do perímetro encefálico ocorrem deformações no crânio, que incluem suturas sobrepostas, protuberância occipital, e com menos frequência, dobramentos da pele (Figura 5C). Não é comum na microcefalia associada às outras infecções apresentarem essas particularidades. Além disso, padrões de calcificações intracranianas subcorticais, ventriculomegalia, redução do volume do

parênquima, malformação do tronco cerebral e agenesia/disgenesia do corpo caloso, separam cada vez mais a microcefalia associada à Zika das demais infecções que causam alterações congênitas (Quadro 1) (LEVINE *et al.*, 2017).

Quadro 1. Diferenças entre as manifestações clínicas das principais infecções congênitas clínicos.

Infecções congênitas	Manifestações clínicas
Toxoplasmose	Corioretinite, hidrocefalia e calcificações intracranianas difusas
Rubéola	Catarata, perda auditiva, murmúrio do coração
Citomegalovírus	Corioretinite, calcificação intracraniana, microcefalias, sinequias intraventricular, leucomalácia periventricular, polimicrogiria
Herpes simples	Sepse no período neonatal, microcefalia, calcificação intracraniana, microftalmia e displasia retinal.
Zika	Microcefalia grave com crânio colapsado, artrogripose, calcificação intracraniana subcorticais.

Fonte: Levine et al 2017; Devakumar et al, 2018.

O uso de modelos animais apontou para algumas variáveis que podem estar envolvidas nos diferentes desfechos da infecção pelo vírus Zika, tais como, linhagem do vírus, hospedeiro e via de administração. Primeiramente, quanto a linhagem do vírus, foi observado que a linhagem Cambodia 2010 resulta em infecção assintomática em gestantes, com complicações cerebrais para o feto, diferente de outras que causam sintomas na mãe e no filho. Em seguida, a utilização de hospedeiros diferentes, mas com a mesma linhagem e via de transmissão, levou a resultados divergentes, variando de neuroinflamação à nenhuma alteração no cérebro. Por fim, a via de administração também manifestou resultados distintos, pois a infecção por via subcutânea resultou em infecção no feto, sendo que, quando utilizado a via intravaginal, não foi observado transmissão vertical (NARASIMHAN *et al.*, 2020).

Os exames de ultrassonografia mostraram que as malformações do desenvolvimento do cérebro, como calcificações, redução do volume cerebral, ventriculomegalia e microcefalia, podem ser encontradas ainda na vida intraútero do feto em mães com o diagnóstico positivo para Zika (MELO *et al.*, 2016). Usando modelos animais, pesquisadores mostraram que células nervosas expostas ao vírus Zika sofrem apoptose e redução da capacidade proliferativa. Dessa forma, o vírus, além de impactar o desenvolvimento fetal, pode ter efeitos negativos também no cérebro adulto (LI, Hongda *et al.*, 2016).

2.5 A Síndrome da Zika Congênita no Maranhão

Um grupo de pesquisa coordenado pelo Dr. Antônio Augusto Moura da Silva iniciou as investigações com um grupo de crianças assistidas pelo Centro de Referência em Neurodesenvolvimento, Assistência e Reabilitação de Crianças (NINAR). O estudo descreveu as anormalidades neurológicas, as alterações nos exames de imagens, e o fenótipo de 48 crianças identificadas como casos altamente prováveis da SZC. Os sintomas neurológicos iniciaram entre o terceiro e quarto mês de vida manifestando síndromes piramidal/extrapiramidal, epilepsia, convulsões e disfagia. As principais alterações na tomografia computadorizada foram calcificações, mal formação cortical e ventriculomegalia. Já o fenótipo foi caracterizado pela presença de microcefalia grave e interrupções na sequência do crânio fetal que incluiu a desproporção craniofacial, a depressão biparietal, a proeminência occipital e o excesso de pele na nuca (*cutis girata*). Além desses resultados, é importante ressaltar que o escore Z do perímetro cefálico aumentou negativamente até o quarto mês, mesmo quando a criança nascia sem microcefalia, a qual se desenvolvia após o nascimento (SILVA, *et al.*, 2016).

Uma análise mais robusta foi realizada por Cavalcante et al. (2021) usando uma amostra com 93 crianças acompanhadas por 36 meses. Eles observaram que as crianças que nasceram com microcefalia apresentaram alguns aspectos clínicos, neurológicos, oftálmicos e motores piores quando comparado com crianças que nasceram sem microcefalia, mas ainda assim, ambos os grupos se igualavam com o decorrer do tempo, sendo mais evidente a diminuição do escore Z do perímetro cefálico.

Seguindo com a investigação da coorte acompanhada pelo grupo de pesquisa, Ribeiro et al (2020) agruparam as crianças utilizando o resultado do Teste de Neutralização de Redução de Placas (PRNT - *Plaque Reduction Neutralization Test*) e

observaram que mesmo as crianças que apresentaram o resultado negativo, o escore Z do perímetro cefálico dobrou em 24 meses, indicando uma resposta inflamatória em curso durante esse período.

2.6 Imunopatogênese da Zika

O mal prognóstico nos neonatos não está, provavelmente, somente relacionado aos aspectos da infecção viral, mas sim, aos efeitos da resposta imune-inflamatória do indivíduo. Investigando a reposta de células mononucleadas de pacientes com Dengue moderada e grave, observaram que a gravidade da doença está relacionada com o aumento da apoptose induzida não apenas pelo vírus, mas também, pela ação de citocinas inflamatórias (JAIYEN *et al.*, 2009a). Igualmente, altos níveis de citocina IL-6, TNF-α, IL-1β, e MCP-1 foi detectada em micróglia infectada pelo vírus Zika sugerindo a participação da neuroinflamação na patogênese da Zika (LUM *et al.*, 2017).

Poucos estudos têm enfatizado a imunopatogênese da infecção pelo vírus Zika (CULSHAW; MONGKOLSAPAYA; SCREATON, 2018). Foi demonstrado que a via de entrada do vírus Zika na célula hospedeira é o receptor AXL. Esse receptor está presente em células como a microglia e astrócitos. Além disso, esse receptor ativa a via de sinalização do MYD1, uma molécula importante para desencadeamento da resposta imune inata (MEERTENS *et al.*, 2017).

Alguns estudos investigaram a participação das células inatas no curso da infecção e encontraram que células epidérmicas como queratinócitos e células dendríticas imaturas são permissivas à infecção pelos vírus da família flaviviridae (Hamel et al. 2015). Resultados de infecção pelo vírus Zika em monócitos *in vitro* mostrou que essas células estão envolvidas no processo da doença, entretanto, a resposta dos monócitos durante as infecções virais ainda não está elucidada (MICHLMAYR *et al.*, 2017).

O reconhecimento do RNA viral ativa componentes da imunidade inata, como a expressão de IFN do tipo I, e também a resposta inflamatória, a partir da expressão de citocinas e quimiocinas devido ativação do fator de transcrição NF-κB (TSAI *et al.*, 2009). Essa inflamação inicial, por sua vez, pode conduzir ao estresse celular e ativar vias da resposta oxidativa, que dentro do contexto das infecções virais, é importante para eliminação do vírus, mas pode ser determinante na evolução da infecção para uma forma crônica da doença (CAMINI *et al.*, 2017).

O balanço redox desempenha um papel importante no desfecho de infecções virais (AMATORE *et al.*, 2015; IVANOV *et al.*, 2013). Durante a infecção pelo vírus Influenza a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) está associada à resposta imune e inflamatória e a modulação da replicação viral (AMATORE *et al.*, 2015). Membros da família Flaviviridae, como o vírus da Hepatite C, promovem o estresse oxidativo e modulam o sistema antioxidante, levando a inflamação crônica (IVANOV *et al.*, 2013). Durante a infecção pelo vírus da Dengue observou-se que o estresse oxidativo aumentava a gravidade da doença (OLAGNIER *et al.*, 2016).

Apesar do aumento de EROs estar relacionado aos efeitos deletérios, já se tem evidências que a resposta oxidativa é de suma importância para resposta antiviral efetiva. Monócitos de pacientes deficientes na enzima G6PD são mais susceptíveis ao vírus da Dengue (AL-ALIMI *et al.*, 2014), sugerindo assim uma ligação entre o estado redox do hospedeiro e a resposta ao vírus.

O sistema NADPH oxidase é uma via importante de EROs para regulação da resposta viral. A produção de EROs por esse complexo enzimático transmembrana, acionada pelo reconhecimento do genoma viral, atua diretamente na ativação de fatores de transcrição da resposta antiviral e inflamatória, na indução da apoptose, bem como na expressão de genes da reposta antioxidante, estabelecendo um estado de homeostase redox (OLAGNIER *et al.*, 2014).

Além dos componentes inatos, o entendimento da resposta linfocitária também é importante para o direcionamento da resposta antiviral. Por certo, a análise do perfil de citocinas de pacientes com Zika durante a fase aguda revelou uma ativação modesta do sistema imunológico. Entretanto, quando se investigou o perfil de citocinas presente no líquido amniótico de gestantes positivas para Zika e com filhos microcefálicos, foi detectado um aumento de citocinas e quimiocinas inflamatórias, sugerindo que a infecção pelo vírus Zika provoca a ativação do sistema imunológico no ambiente intrauterino, resultando em danos ao desenvolvimento fetal (ORNELAS *et al.*, 2017).

O padrão da resposta imune materna a infecção por Zika está relacionada ao desfecho nos neonatos (CUGOLA *et al.*, 2016). Amostras de tecidos neurais de casos fatais da SZC apresentaram um infiltrado inflamatório com necrose e apoptose celular e prevalência de macrófagos M2 (AZEVEDO *et al.*, 2016). De outra forma, Cugola et al (2016) mostraram a partir da infecção de camundongos fêmeas grávidas de diferentes linhagens, que nas que apresentavam padrão de resposta imune Th1 não ocorria transmissão do vírus para sua prole e nem danos no sistema nervoso.

Considerando que os componentes da resposta imune materna são determinantes para o surgimento da SZC, é mais provável que a infecção pelo vírus Zika ocorra em mulheres com ausência de imunidade para dengue (REGLA-NAVA *et al.*, [*s. d.*]). Entretanto, um estudo mostrou que a microcefalia pode estar relacionada a esse tipo de imunidade. Produtos virais ativam respostas imunes diferentes (pro e anti-inflamatórias) resultando na produção de citocinas, tais como, TNF-α, IL-4, IL-13 e TGF-β (REYNOLDS *et al.*, 2020).

Concentrações elevadas de citocinas inflamatórias em mães submetidas a situações de estresse durante a gravidez, como infecções, problemas psicossociais e obesidade, estão associados ao maior risco da prole desenvolver problemas neuropsiquiátricos (KHAMBADKONE; CORDNER; TAMASHIRO, 2020). O papel patológico das citocinas já foi relatado na gestação. Por exemplo, o a família do IFN bloqueia o desenvolvimento da placenta após a infecção com vírus Zika; o TNF-α é tóxico para a formação inicial do embrião, causando defeitos no tubo neural; as citocinas IL-6 e IL-17 estão associadas ao fenótipo autista e ao desenvolvimento anormal do cérebro (YOCKEY; IWASAKI, 2018).

Modelos de ativação imune materna baseados em modelos animais relacionam as infecções virais com o desenvolvimento de desordens neurológicas, ressaltando a participação de linfócitos Th17 (ESTES; MCALLISTER, 2016). Além disso, a manifestação de fenótipo cortical anormal está relacionada com IL-17, assim como os comportamentos antissociais na vida adulta (CHOI *et al.*, 2016; YOCKEY; IWASAKI, 2018).

O aparecimento tardio de sequelas neurológicas e déficits comportamentais foi demostrado em modelo murino de infecção com o vírus Zika. Os autores observaram a permanência de partículas virais em células reservatórios no sistema nervoso, mesmo um ano após a infecção, sendo provável foco de estímulo para manutenção de resposta inflamatória, pois observaram aumento de apoptose de neurônios ativos, bem com infiltrado celular de astrócitos e micróglia ativados (IRELAND *et al.*, 2020).

A descoberta de marcadores imunológicos que norteiem o prognóstico da infecção pelo vírus Zika é relevante para estratégias de vigilância epidemiológica e determinar estratégias de tratamento. Após três anos do surto, o número de casos tanto da doença, como de nascimentos com malformação diminuiu significativamente (França et al. 2018). Entretanto, hoje temos outro problema de saúde pública que é a população de crianças com a síndrome congênita associada ao vírus Zika. Ainda não há estudos que informem

o perfil imunológico dessas crianças, nem de suas mães, com intuito de correlacionar com o tipo de manifestações clínicas que ambos apresentaram.

Portanto, o presente estudo tem o objetivo de investigar o perfil imunológico de mães que tiveram a infecção durante a gestação e de seus filhos que apresentaram malformação congênita associada à infecção pelo vírus Zika e correlacioná-lo com os sintomas.

3. OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar a influência da resposta imune e do estresse oxidativo no estabelecimento da Síndrome Congênita da Zika.

Objetivos específicos

- Avaliar a resposta imunológica pela caracterização funcional e fenotípicas das populações de células imunes e perfil de citocinas produzidas pelas mães e filhos;
- Investigar a correlação da resposta oxidativa no desfecho da infecção pelo vírus Zika nas mães e em seus filhos;
- Correlacionar o perfil de resposta imune entre mães e filhos;
- Estabelecer um perfil imunológico para a gravidade da Síndrome da Zika Congênita.

4. MATERIAL E MÉTODOS

4. 1. Desenho do estudo

Trata-se de uma coorte prospectiva formada por mães e seus filhos, residentes em diferentes municípios do Estado do Maranhão e acompanhadas pelo Centro de Referência em Neurodesenvolvimento, Assistência e Reabilitação de Crianças (NINAR). Para o presente estudo foram realizadas coletas de sangue da mãe e seus filhos durante os meses de setembro a dezembro de 2017 e julho a outubro de 2018, quando as crianças possuíam em média 20 meses de idade.

Foi considerado como critério de inclusão no estudo crianças que apresentaram pelo menos uma das seguintes alterações no exame de imagem craniano: calcificações, redução do volume do parênquima cerebral, ventriculomegalia, malformação do desenvolvimento cortical, malformação/hipoplasia de cerebelo, malformação/hipoplasia do tronco cerebral e agenesia/disgenesia do corpo caloso (SILVA, *et al.*, 2016). Foram excluídas crianças que apresentaram causas alternativas de síndrome congênita (e.g. TORCHS positivo). Ademais, o grupo controle foi formado por mães que procuraram o acompanhamento por apresentarem sinais e sintomas relacionados a Zika durante a gravidez e que seus filhos nasceram sem manifestações clínicas.

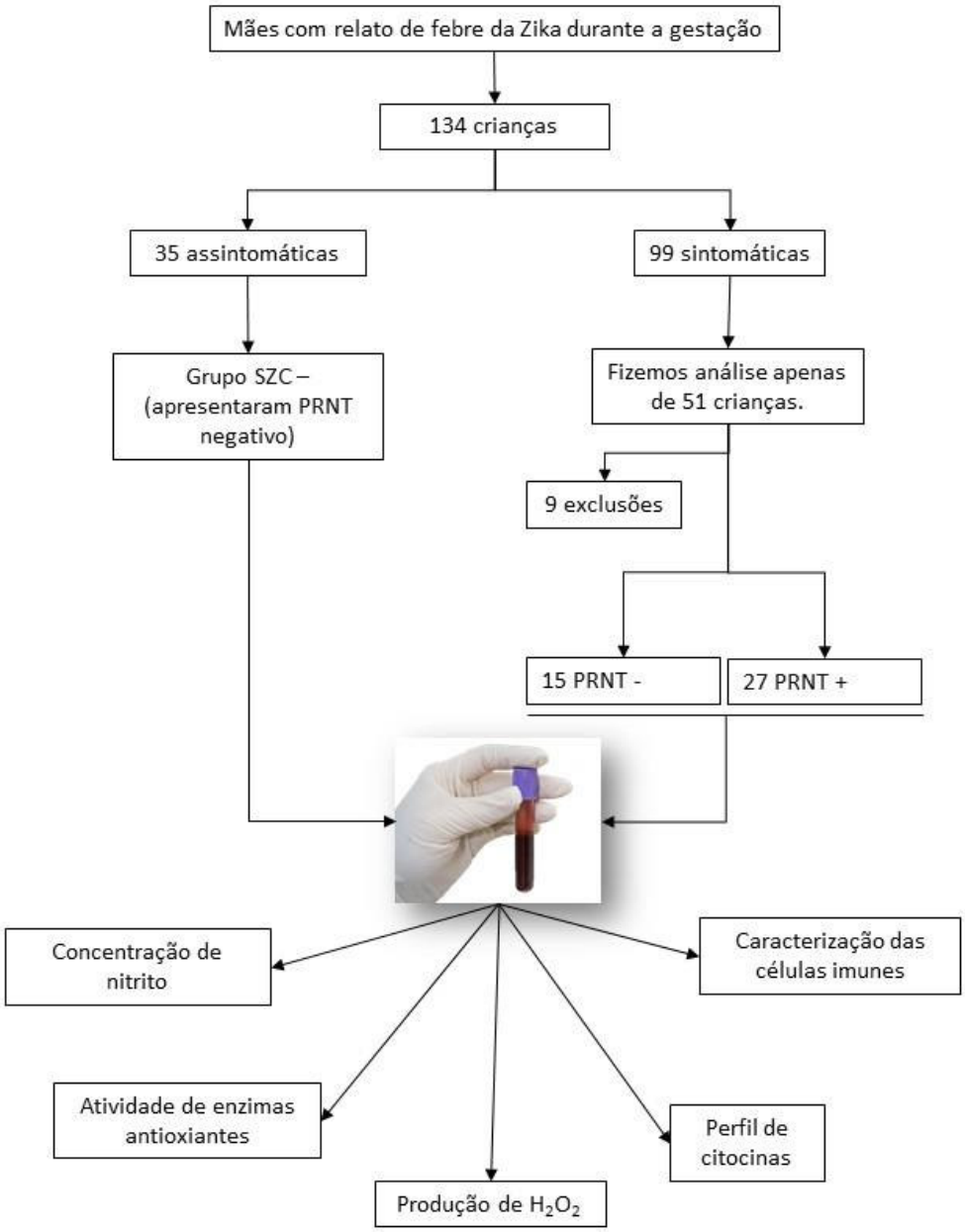


Figura 6. Desenho do estudo. Crianças nascidas de mães que sinais e sintomas relacionados com a febre da foram agrupadas em assintomáticas e sintomáticas. Foi realizado o teste PRNT em todas as crianças. Todas as crianças assintomáticas apresentaram PRNT negativo formando o grupo SZC-. Entre as crianças sintomáticas 15 apresentaram o PRNT negativo, formando o grupo PRNT-, e 27 apresentaram PRNT positivo, formando o grupo PRNT+. No entanto, 9 crianças foram excluídas por ter sido identificados outras possíveis causas de anormalidades congênitas.

4.2 Aspectos éticos

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário do Maranhão (CAAE: 65897317.1.0000.5086). O Termo de Consentimento Livre Esclarecido foi apresentado as mães ou responsáveis pelas crianças, ressaltando a importância da pesquisa e retorno para comunidade.

4.3 Teste de Neutralização por Redução de Placas (PRNT)

O PRNT (Teste de Neutralização por Redução de Placas) foi executado com base no protocolo previamente descrito, com algumas adaptações (BAER & KEHN-HALL, 2014). O Teste PRNT baseia-se na interação antígeno-anticorpo, onde o anticorpo anti-Zika presente na amostra é diluído seriadamente e colocado em contato com uma monocamada de células infectadas pelo vírus Zika. Após a incubação, observa-se a formação de pequenas placas provocada pela lise das células devido a infecção viral, que, no caso da amostra positiva, os anticorpos neutralizarão a formação dessas placas. O valor de corte para a positividade do PRNT foi definido como 50% (PRNT50). O PRNT50 foi realizado para determinar a diluição máxima do soro (1: 8 a 1: 4096) necessária para reduzir a formação de placa do ZIKV em 50%. Para isso, utilizou-se célula Vero (2x105 célula/poço) e a cepa ZIKV PE / 243, isolada no Brasil (100 PFU/ poço). Todos os soros foram inativados (56 ° C, 60 min) antes do teste de neutralização. As amostras de soro passaram por uma diluição seriada em meio de Dulbecco Eagle modificado (DMEM, Gibco) contendo 2% de soro fetal bovino (SFB, Gibcon) e 1% de penicilina / estreptomicina. Em seguida, 250 µl de vírus (100 PFU/poço) foram adicionados a cada poço contendo soro diluído (1:1). As diluições do soro e do vírus foram então incubadas a 37 ° C durante 60 minutos. Um volume final de 200 µl de cada soro e vírus foi transferido para um poço contendo células Vero e depois incubado a 37 ºC durante 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 300 µl de solução de agarose a 0,6% e as placas foram reincubadas a 37 ° C durante 5 dias. As reações foram então reveladas usando solução de Naftol Blue Black (Sigma Aldrich) a 2%. Títulos ≥10 foram considerados positivos.

4.4 Imunofenotipagem

Foi retirada uma alíquota de 100µl do sangue total e feita a hemólise utilizando tampão comercial (RBC Qiagen) numa proporção de 1:10. Posteriormente as células foram incubadas com anticorpos conjugados com fluorocromos a 4ºC por 30 minutos. Em seguidas as células foram lavadas com solução tamponada de fosfato e adquirida em aparelho de citometria BD FACSCalibur.

Os anticorpos foram divididos em 6 painéis: CD3 FITC /CD4 PE/ CD8 PeCy5; CD3 FITC/CD19 PeCy5; CD14 FITC/HLA-DR PE; CD15 FITC/CD66b PerCp 5.5. Análise dos dados adquiridos no citômetro foram analisados com auxílio Software FlowJo.

4.5 Avaliação da produção de peróxido de hidrogênio

A análise dessa resposta foi realizada por meio da quantificação indireta da produção de peróxido de hidrogênio (H2O2) pela oxidação da dihidrorodamina (DHR)-123 em rodamina-123, conforme descrito previamente (Quach et al., 2019). Para tanto, os monócitos de sangue periférico foram estimulados ou não com PMA (Phorbol 12-myristate 13-acetate, 50 nM) por uma hora. Em seguida, o DHR foi adicionado às células, sendo essas incubadas por 30 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. A região de células vivas foi determinada usando os parâmetros de forward (FSC) versus side scatter (SSC), sendo coletados 10000 eventos em cada amostra. Para a análise dos resultados utilizamos o software FlowJo (Becton, Dickinson and Company). A partir dessa avaliação obtivemos dados de porcentagem da população celular produtora de H2O2 e a quantidade desse reativo produzida, sugerida pela intensidade média de fluorescência (MFI).

4.6 Dosagem de citocinas por citometria de fluxo (CBA – citometryc bead array).

As dosagens de citocinas no plasma foram realizadas pelo método Cytometric Bead Array (CBA). Os biomarcadores avaliados foram IL-17, IL-10, IL-6, IL-4, IL-2, TNF-α e IFN-γ através do kit laboratorial específico (Kit CBA Humam Th1 Th2 Th17, BD Biosciences, San Diego, CA Em resumo, os plasmas e padrões de citocinas do kit foram incubados com microesferas de captura recobertas com anticorpos específicos para as respectivas citocinas, com o anticorpo de detecção marcado com ficoeritrina (PE) e o reagente de detecção. Após 2 horas, foram lavadas com solução tampão fornecida pelo

kit e centrifugadas por 5 minutos a 200 x g (rcf). O pellet foi então suspenso em solução tampão e levado para leitura no equipamento FACS Calibur (BD Biosciences, San Diego, CA). A análise dos resultados foi feita no programa FCAP array. A quantificação pg/mL de cada citocina foi baseada em curva padrão, realizada com concentrações conhecidas.

4.7 Dosagem de Superóxido Dismutase (SOD)

Os reagentes utilizados para determinação da atividade da SOD foram provenientes do kit de Ensaio da SOD (Sigma – Aldrich, St. Louis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Vinte microlitros dos plasmas foram incubados em placa de 96 poços à 37 °C por 20 minutos com 20µL da solução de xantina oxidase e 200µL da solução WST (sal de tetrazólio).

A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro à 450 nm e, após a leitura dos brancos, os resultados foram expressos na forma de atividade da SOD (%), calculada em relação ao padrão de atividade mínima de SOD (100% de formação de corante WST – Formazan) representado pelo branco 1, de acordo com a fórmula abaixo:

$$\text{Atividade da SOD (\%)} = \frac{(\text{Abranco1} - \text{Abranco3}) - (\text{Aamostra} - \text{Abranco2}) \times 100}{(\text{Abranco1} - \text{Abranco3})}$$

4.8 Dosagem de Arginase

Os reagentes utilizados para a determinação da atividade da arginase foram derivados do kit de Ensaio da Atividade da Arginase (Sigma Aldrich, St. Louis, EUA), de acordo com as instruções do fabricante.

Cem microlitros dos plasmas foram transferidos para os filtros Amicon Ultra 0,5 mL – MWCO 10KDa (Merck, Darmstadt, Alemanha) e diluídos com até 500µL de água, a fim de retirar a ureia fisiológica, e centrifugados à 14000 x G durante 30 minutos. O procedimento foi realizado duas vezes.

Ao término da filtração, metade do volume obtido foi incubado em placa de 96 poços à 37 °C por 2 horas com 10µL do substrato tamponado contendo arginina. Passado esse tempo, foram adicionados 200µL do reagente de ureia e a placa novamente incubada por 1 hora à temperatura ambiente.

A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro à 430 nm e, após a subtração da leitura dos respectivos brancos das amostras, foi determinada a atividade da arginase tendo como referência a absorbância obtida por 50µL de padrão de ureia (1mM), seguindo a fórmula abaixo disponibilizada pelo fabricante, onde "T" é o tempo de reação (min), "V" é o volume de amostra utilizada após a filtração, "1nM" é a concentração do padrão de ureia e "50" é o volume de reação do padrão.

Os resultados foram expressos em unidades/litro, onde 1 unidade de arginase é a quantidade de enzima que converte 1µmole de L-arginina à ornitina e ureia por minuto à 37 °C e pH 9,5.

$$\text{Atividade de Arginase} = \frac{(A_{430})_{\text{amostra}} - (A_{430})_{\text{branco}}}{(A_{430})_{\text{padrão}} - (A_{430})_{\text{água}}} \times \frac{(1\ \text{mM} \times 50 \times 10^3)}{(V \times T)}$$

4.9 Dosagem de Óxido Nítrico pelo plasma

Essa dosagem ocorreu utilizando método descrito anteriormente para a dosagem de Nitrato, com algumas modificações (MIRANDA et al., 2001). O ensaio consistiu, inicialmente, na desproteinização do plasma quando 160µL das amostras foram transferidas para um microtubo e adicionadas de 40µL da solução de Sulfato de Zinco. Centrifugadas a 1000 G, por 5 minutos, a 20ºC.

Ao final, 50µL de cada amostra foram transferidos para uma placa de 96 poços juntamente com 50µL de solução de cloreto de Vanádio 0,08%. Após 30 segundos, foram adicionados a cada amostra 50µL de reagente Griess e incubadas em estufa por 20 minutos.

A leitura das absorbâncias foi feita em espectrofotômetro à 540 nm e, após subtração da leitura de seus respectivos brancos, a concentração de nitrito foi determinada utilizando a curva padrão (2µmol/L, 20µmol/L, 40µmol/L, 80µmol/L e 120µmol/L) e seus resultados foram expressos em µmol/L.

4.10 Análise estatística

A normalidade dos dados pelo teste de Shapiro-Wilk. Para dados com distribuição normal foi usado o teste T de Student para comparação de duas médias. Para os dados sem distribuição normal, foi aplicado o teste de Mann-Whtiney para comparação de duas médias. Os dados foram expressos como a média ± desvio padrão e as diferenças foram consideradas significativas quando $p \leq 0,05$.

A associação entre as variáveis contínuas dos dados epidemiológicos foi verificada pelo Coeficiente de Correlação Pearson.

Toda a análise estatística foi realizada utilizando o software Graphpad Prisma v.5.

5. RESULTADOS

5.1. Caracterização dos pacientes

Participaram do estudo um total de 134 crianças de diferentes municípios do Estado do Maranhão. Inicialmente as crianças foram divididas em dois grupos de acordo com a ausência ou presença de aspectos clínicos sugestivos da SZC. O primeiro grupo foi formado por 35 crianças sem clínica, e o segundo grupo foi composto por 99 crianças com clínica sugestiva da síndrome congênita. Entretanto, para análise dos parâmetros imune-inflamatórios foram coletadas amostras de sangue de 30 crianças do primeiro grupo e de 51 crianças do segundo grupo. Em seguida, após a realização do teste PRNT, as crianças foram reagrupadas de acordo com o diagnóstico laboratorial. As crianças sem clínica apresentaram PRNT50 negativo, formando o grupo denominado SZC-. Dentre as crianças com clínica sugestiva (SZC+), 15 crianças apresentaram PRNT50 negativo, formando o grupo PRNT-, e 27 crianças apresentaram PRNT50 positivo, formando o grupo PRNT+. De acordo com os critérios de exclusão, 9 crianças foram retiradas do estudo.

Para avaliar os componentes imunológicos envolvidos no agravamento da síndrome congênita, coletamos amostras de sangue das crianças e de suas mães para investigarmos os seus perfis imunológicos, abordando a composição da população celular e o padrão de citocinas plasmáticas. Em seguida, avaliamos o estresse oxidativo através da produção de radicais livres e da atividade de enzimas antioxidantes. E por fim, relacionamos a classificação clínica descrita por Mendes et al (2020) com os dados investigados para estabelecer uma associação dos componentes imune-inflamatórios com as manifestações clínicas das crianças.

5.2. Caracterização do perfil imunológico

5.2.1 Perfil imunofenotípico de crianças SZC+ e suas mães.

Para caracterizar o perfil da resposta imunológica associada ao desenvolvimento da SZC, as subpopulações de leucócitos foram identificadas fenotipicamente. As crianças PRNT- apresentaram diferenças no percentual de linfócitos T, em relação ao grupo SZC- e PRNT+ (Figura 7). Não houve diferença no percentual de linfócito B e neutrófilos entre os grupos, mas ambos os grupos com síndrome apresentaram aumento do percentual de monócitos em relação ao grupo SZC-. Em relação às mães, não ocorreu alteração no percentual de linfócitos T, mas houve diminuição de linfócitos B ($CD3^{-}CD19^{+}$) e aumento de neutrófilos ($CD15^{+}CD66b^{+}$) e monócitos ($CD14^{+}HLA^{+}$) nas mães de crianças com síndrome quando comparadas às mães com filhos SZC -.

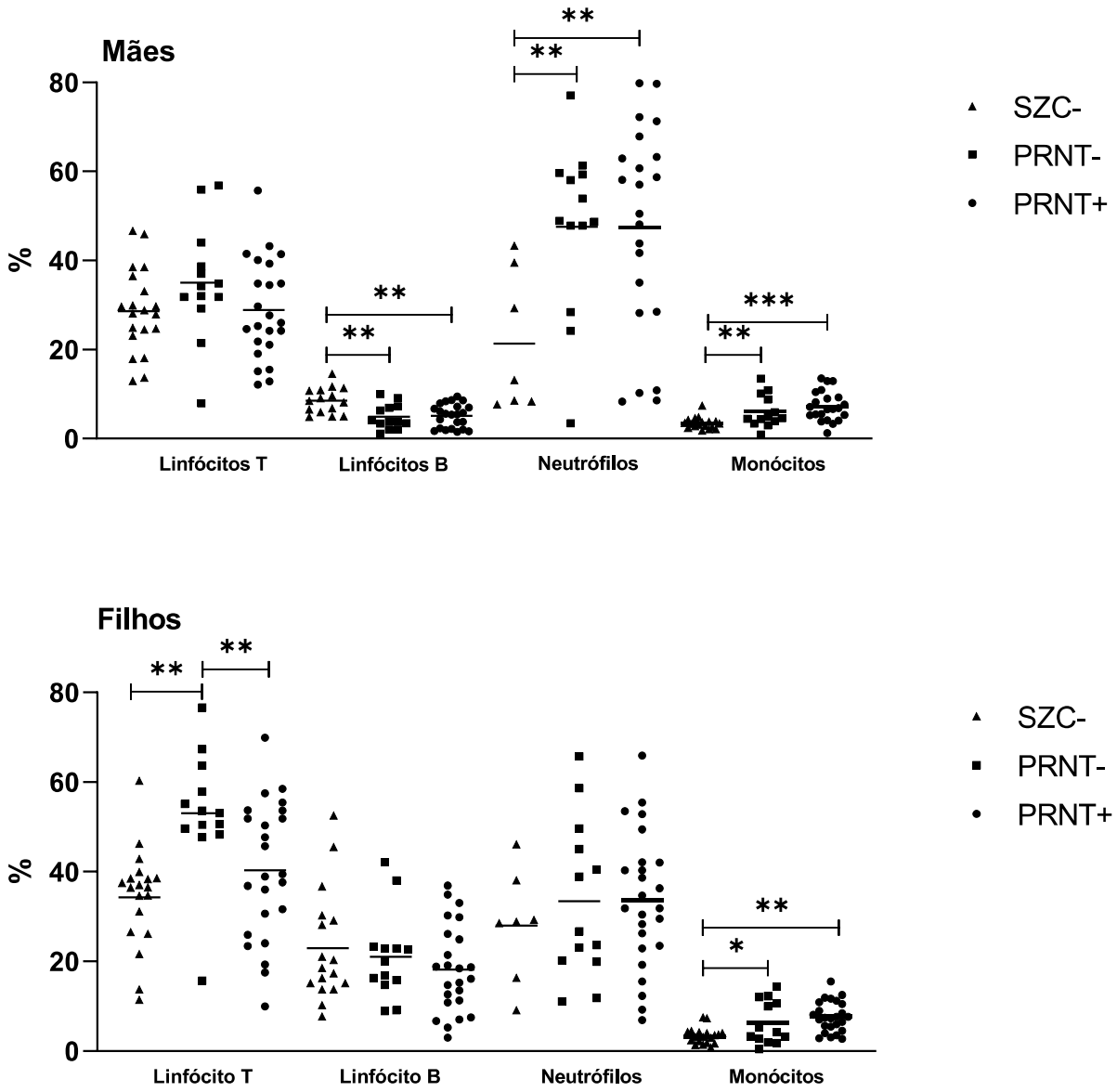


Figura 7. Caracterização fenotípica dos leucócitos de sangue periférico em crianças com SZC e suas mães. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA dos grupos SZC - (N=30), PRNT- (15) e PRNT+ (N=27), e suas respectivas mães. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. Em seguida foi feita a hemólise e com os leucócitos restantes foi realizada a imunofenotipagem. Triângulo, grupo SZC-; quadrado, grupo PRNT-; círculo: grupo PRNT+. (A) perfil das células imunológicas dos filhos; (B) perfil de células imunológicas das mães. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA. (*) $p<0,05$ em relação ao grupo SZC-; (#.) $p<0,05$ em relação ao grupo PRNT+.

Apesar de não termos encontrado diferença no percentual total de linfócitos T, as suas subpopulações, incluindo linfócitos T auxiliares ($CD4^+$) e citotóxicos ($CD8^+$), apresentaram diferença entre os grupos. Tanto os filhos com síndrome (Figura 8A) quanto suas mães (Figura 8B) apresentaram diminuição de linfócitos T auxiliares. Entretanto, somente as crianças PRNT- e suas mães apresentaram aumento de linfócitos T citotóxicos em relação aos grupos SZC- e PRNT+.

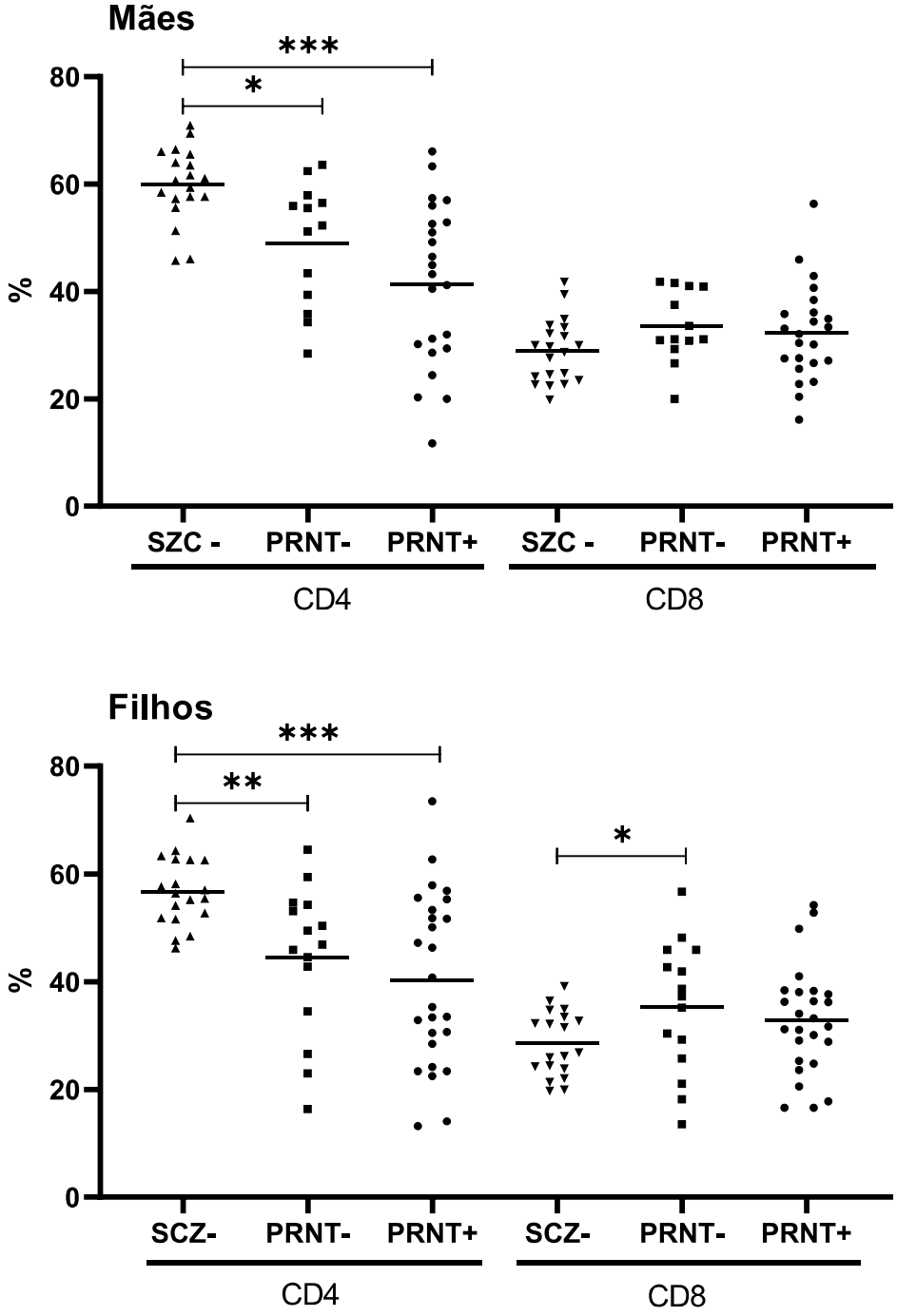


Figura 8. Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T em crianças com SZC e de suas respectivas mães. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA dos grupos SZC - (N=30), PRNT- (15) e PRNT+ (N=27), e suas respectivas mães. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. Em seguida foi feita a hemólise e com os leucócitos restantes foi realizada a imunofenotipagem. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA. (*) $p<0,05$. (A) Perfil das subpopulações de linfócitos das crianças; (B) Perfil das subpopulações de linfócitos das mães.

Para avaliar se o perfil imunofenotípico presente nas mães estaria relacionado com aquele observado nos filhos, foi feita a análise de correlação. A análise demonstrou que as populações de células de mães e filhos PRNT- e PRNT+ possuem uma correlação moderada (Figura 9 e 10), o que não ocorreu entre mães e filhos SZC- (Figura 11).

O grupo PRNT+ apresentou correlações significativas nas populações de linfócitos T, linfócitos T auxiliar e citotóxico, linfócitos B e monócitos, mas não na de neutrófilos (Figura 9)

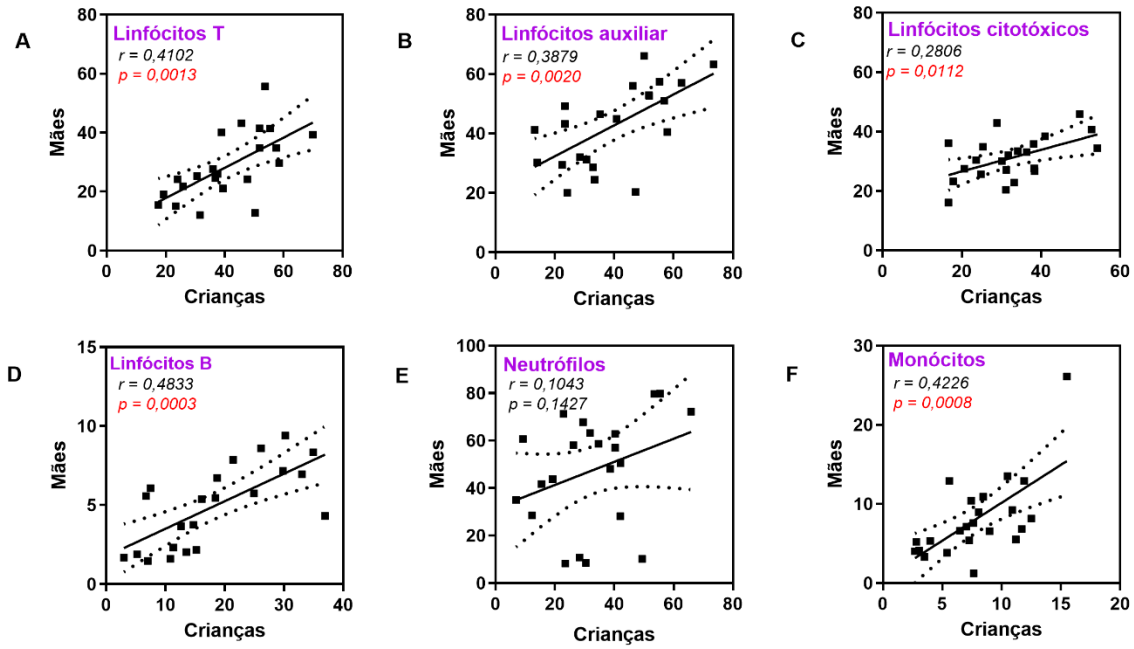


Figura 9. Correlação entre as populações de leucócitos das crianças PRNT+ e de suas mães. As correlações foram verificadas utilizando o teste de Pearson, $p < 0,05$.

O grupo PRNT- apresentou correlações significantes nas subpopulações de linfócitos T auxiliar e citotóxicos, bem como nas populações de neutrófilos e monócitos, entretanto, não mostrou uma correlação significativa nas populações de linfócito T e B (Figura 10).

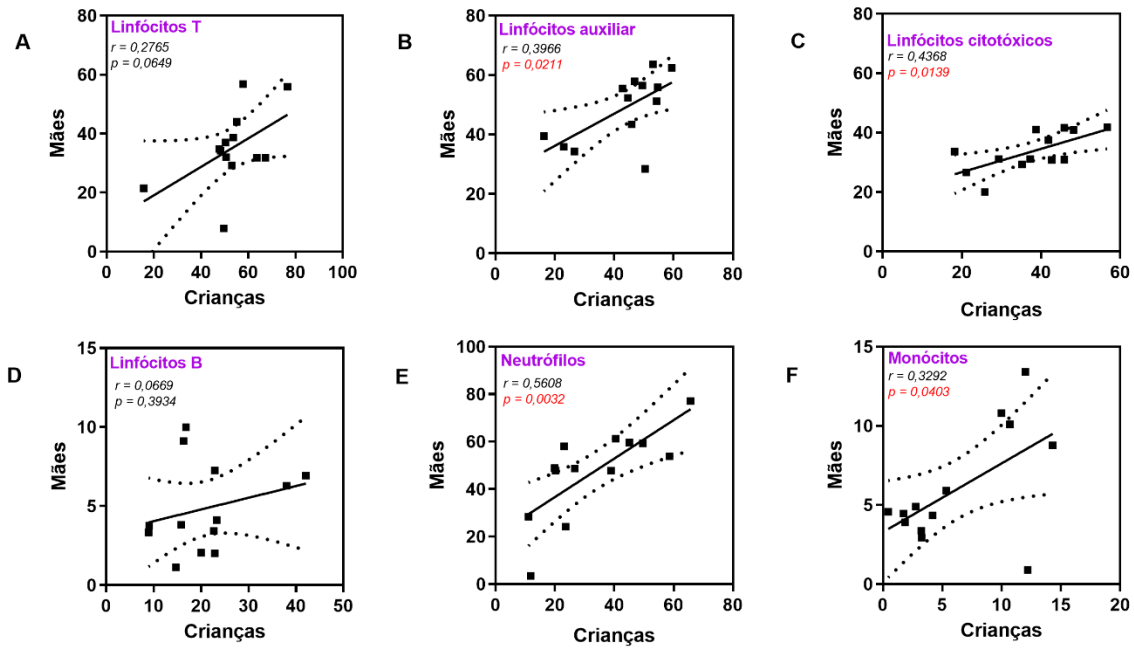


Figura 10. Correlação entre as populações de leucócitos das crianças PRNT- e de suas mães. As correlações foram verificadas utilizando o teste de Pearson, $p < 0,05$.

O grupo SZC- apresentou uma correleção forte e significativa apenas na população de neutrófilos. Nas demais populações celulares não houve correlação (Figura 11).

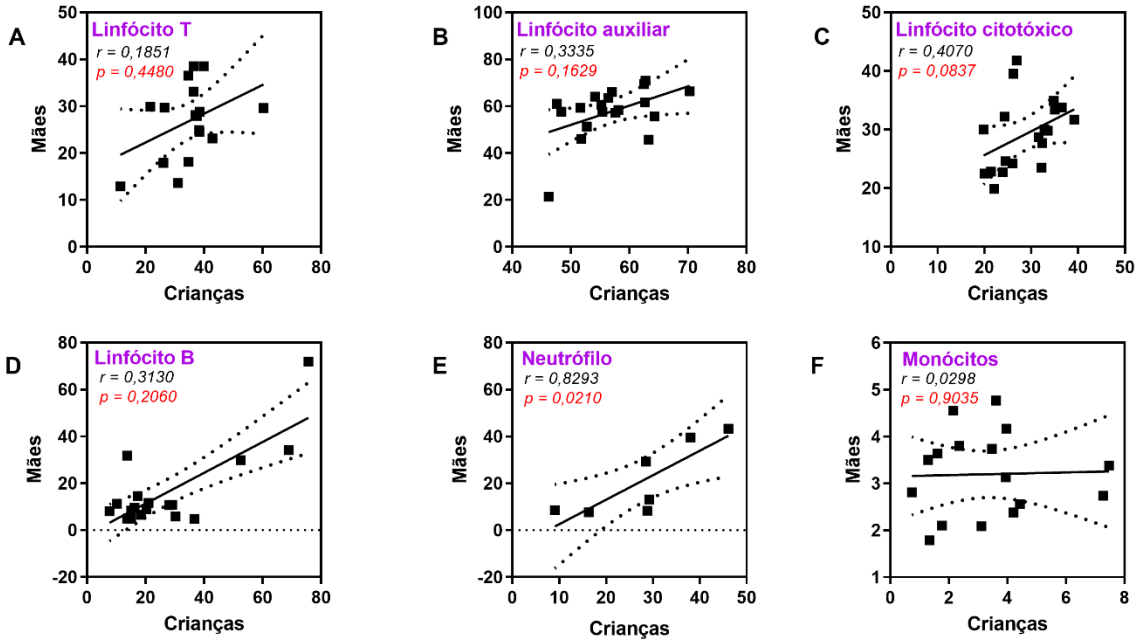


Figura 11. Correlação entre as populações de leucócitos das crianças SZC- e de suas mães. As correlações foram verificadas utilizando o teste de Pearson, $p < 0,05$

5.2.2 Avaliação do perfil de citocinas na SZC.

Considerando as alterações observadas em relação aos linfócitos T, investigamos o perfil de citocinas dos três padrões distintos de resposta linfocitária. A análise do perfil de citocinas plasmáticas das crianças demonstrou que não houve diferença entre os três grupos em relação a IL-2, TNF-α, IL-6, e IL-4 (Figura 12). No entanto, o grupo PRNT+ apresentou um aumento de IL-17 em relação ao grupo SZC- (Figura 12G), e o grupo PRNT- apresentou aumento de IFN-γ (Figura 12F) e IL-10 (Figura 12G) em relação aos outros dois grupos.

A análise das citocinas plasmáticas das mães revelou que as mães de crianças PRNT- apresentaram aumento de IL-2, TNF-α, IL-6, IL-4, IL-10 e IL-17 em relação ao grupo SZC-, além do aumento de IL-10 em relação ao grupo PRNT+ (Figura 13). Ao passo que, o grupo PRNT+ só apresentou aumento de IL-6 (Figura 13D) e IL-17 (Figura 13G).

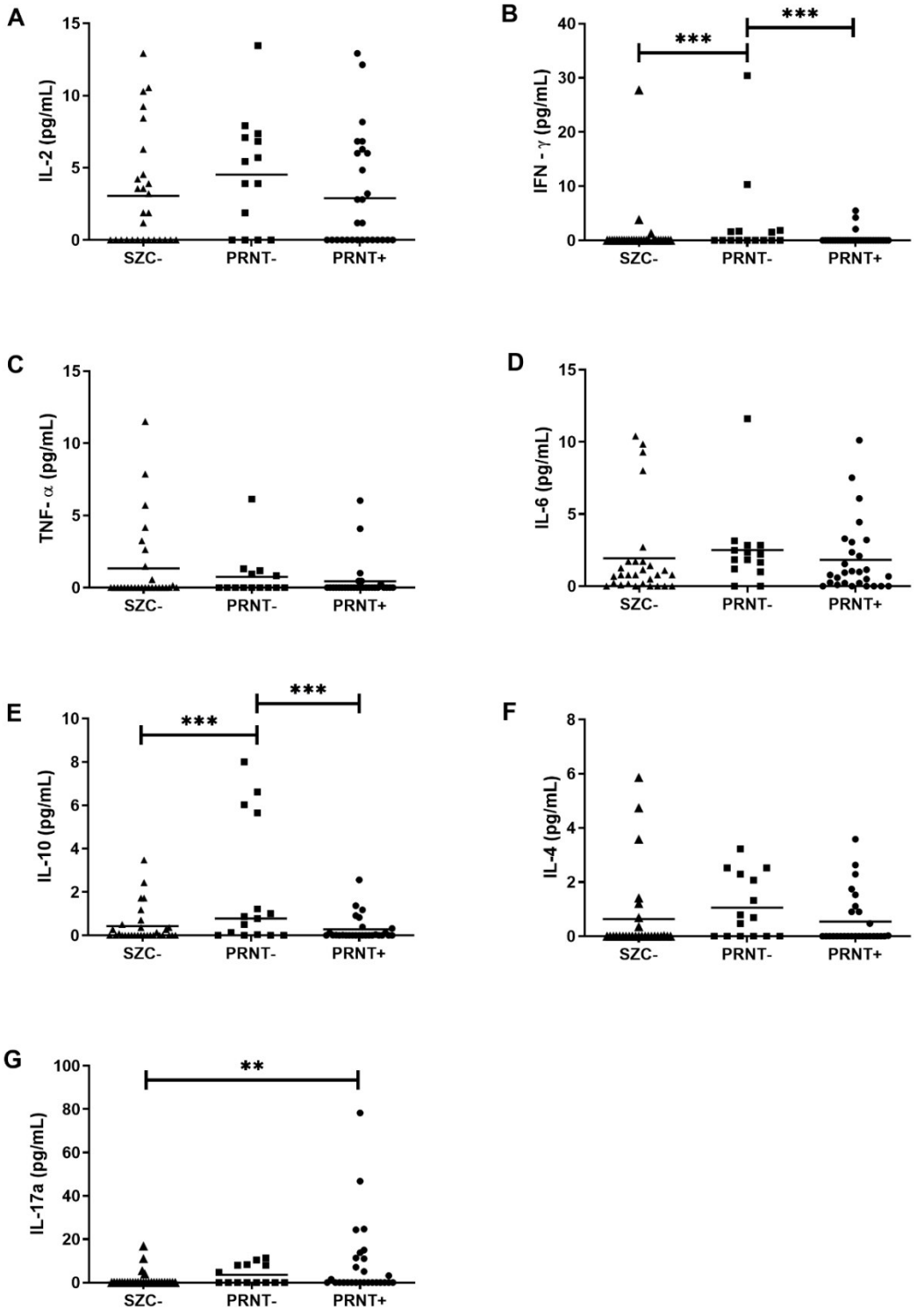


Figura 12. Concentração de citocinas plasmáticas das crianças com SZC. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA dos grupos SZC - (N=30), PRNT- (15) e PRNT+ (N=27). As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. As citocinas foram avaliadas pelo método de captura por beads (CBA) de acordo com os procedimentos recomendado pelo fabricante. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA (*) $p<0,05$.

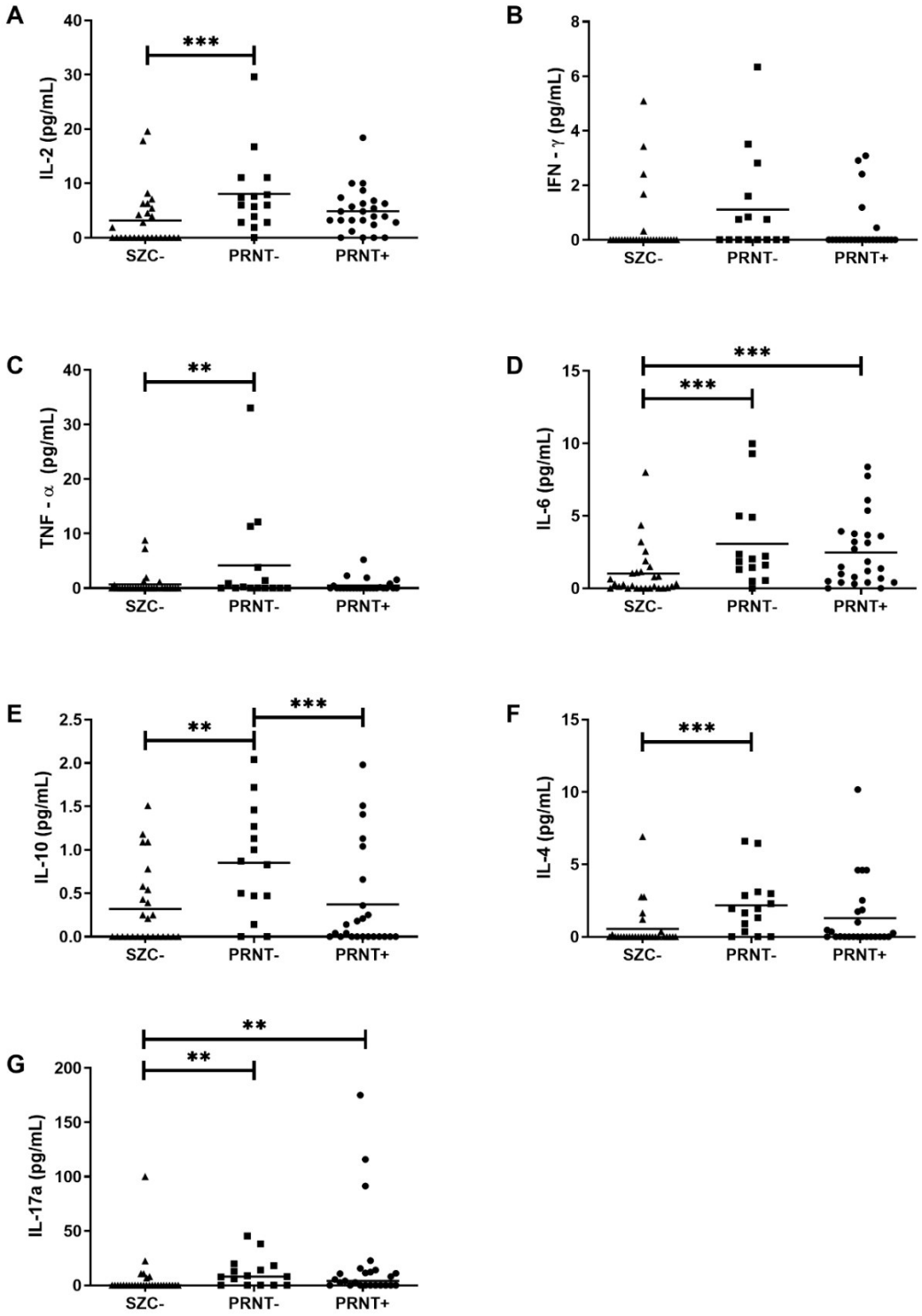


Figura 13. Concentração de citocinas plasmáticas das mães das crianças SZC -, PRNT- e PRNT+. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA dos grupos SZC- (N=30), PRNT- (15) e PRNT+ (N=27). As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. As citocinas foram avaliadas pelo método de captura por beads (CBA) de acordo com os procedimentos recomendado pelo fabricante. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA (*) $p<0,05$

5.2.3 Avaliação da expressão da molécula HLA-DR em monócitos.

A similaridade no aumento da produção de IL-17, uma citocina inflamatória, bem como o aumento percentual de monócitos nas crianças SZC + e suas mães, sugerem um eixo comum entre mães e filhos e por isso estudamos o potencial efetor dos monócitos avaliando o nível de expressão de moléculas HLA de classe II, considerando a análise da média de intensidade de fluorescência (MFI). Foi observado que tanto nos grupos de crianças SZC+, como também em suas mães, houve menor expressão de moléculas de HLA (Figura 14).

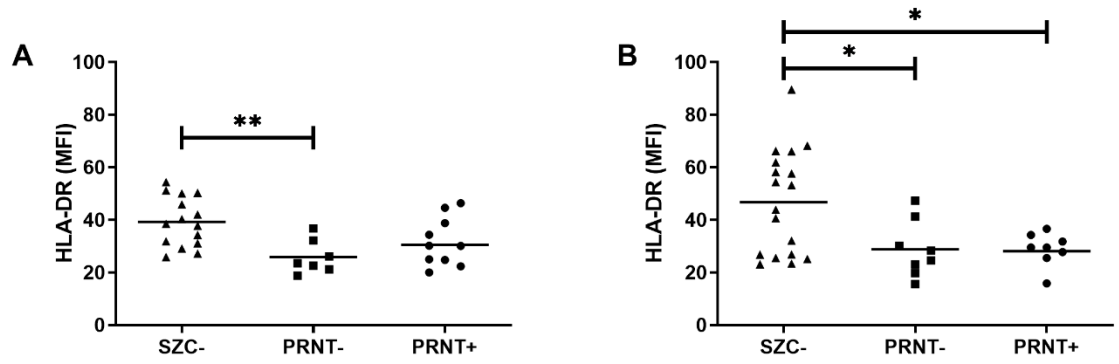


Figura 14. Média da intensidade de fluorescência da molécula HLA na superfície de monócitos do sangue periférico. A população de monócitos foi determinada usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student, (*) $p<0,05$. (A) Expressão de HLA na superfície de monócitos nas crianças. (B) Expressão de HLA na superfície de monócitos nas mães das crianças.

5.3 Avaliação do estresse oxidativo

Avaliamos a produção de peróxido de hidrogênio tanto por monócitos como por neutrófilos por ser um componente da resposta inflamatória responsável por efeitos deletérios. Foi observado que os monócitos tanto de crianças SZC + quanto de suas mães apresentaram aumento da produção de peróxido de hidrogênio (Figura 15 e 16, respectivamente). Com relação aos neutrófilos, somente as mães apresentaram aumento da produção de peróxido de hidrogênio, apenas quando estimulado com o PMA (Figura 16D). Esse aumento parece não estar correlacionado com déficit na produção de enzimas antioxidantes, uma vez que as enzimas SOD e MPO que participam diretamente do metabolismo do peróxido de hidrogênio não estiveram alteradas nas crianças (Figura 17), mas as mães apresentaram menor expressão de MPO (Figura 17D)

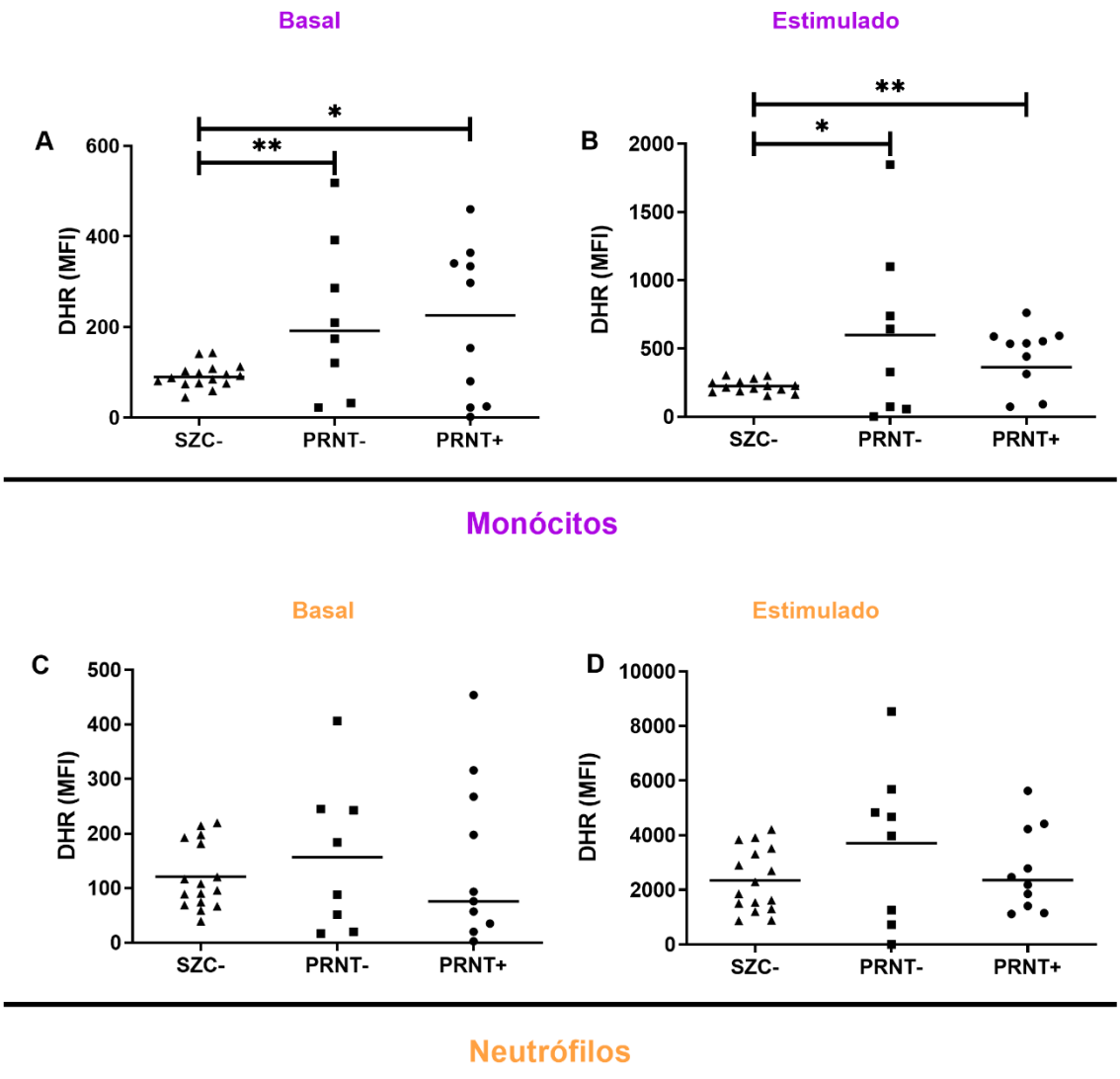


Figura 15. Avaliação da resposta oxidativa das crianças com SZC. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 30 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur e adquiridos. As populações de monócitos e neutrófilos foram determinadas usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA (*) $p<0,05$.

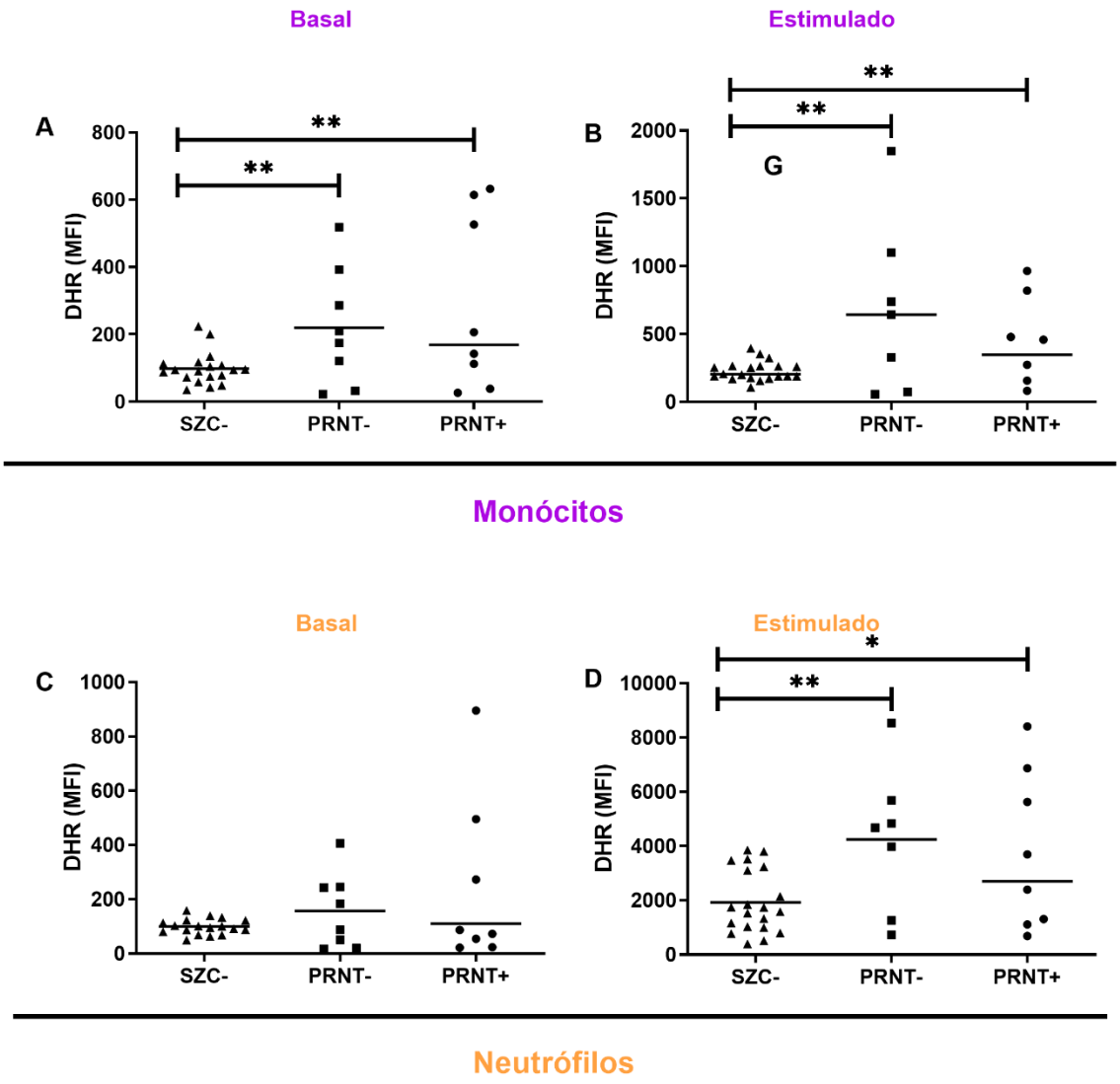


Figura 16. Avaliação da resposta oxidativa das mães de crianças com SZC. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 30 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur e adquiridos. As populações de monócitos e neutrófilos foram determinadas usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA (*) $p<0,05$.

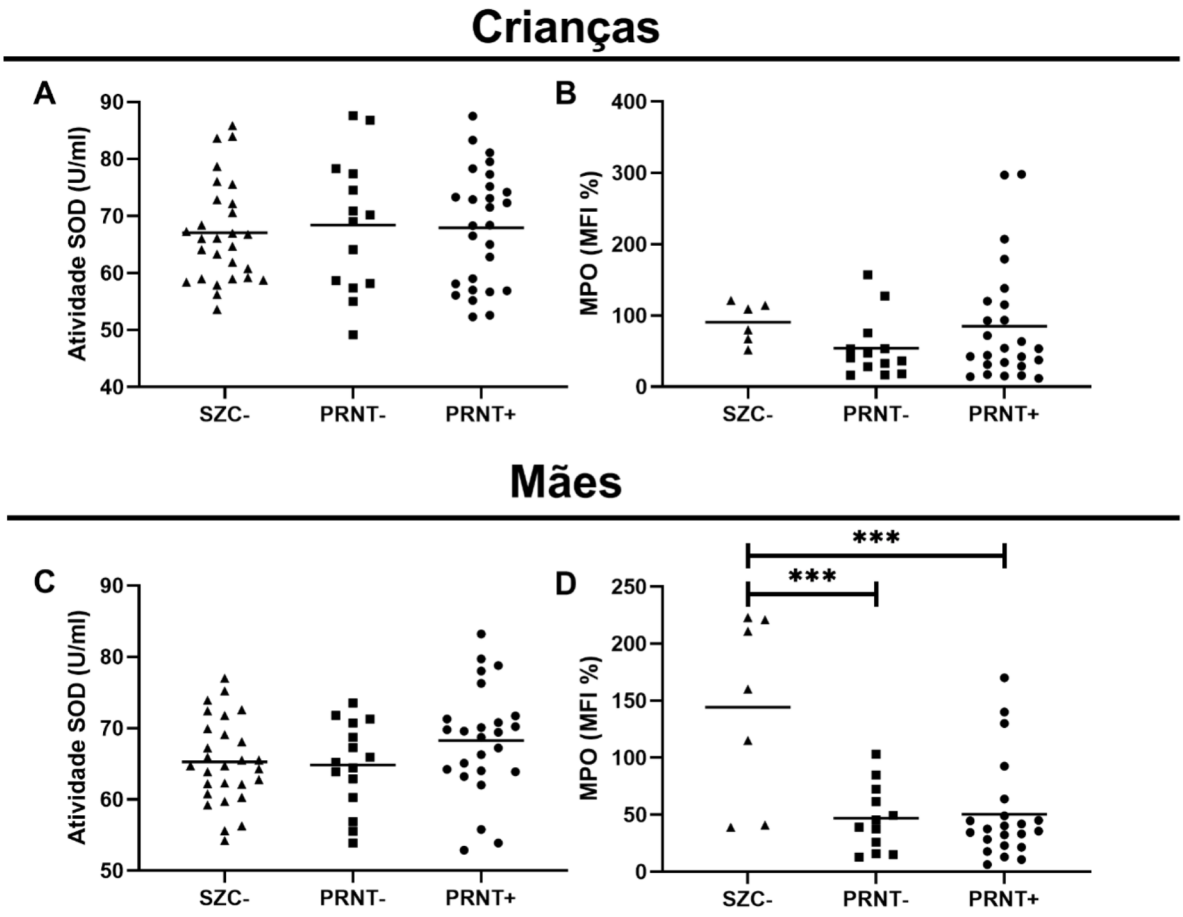


Figura 17. Avaliação da resposta redox na SZC. A atividade da SOD foi mensurada em amostra de plasma utilizando kit comercial. Para análise da expressão de mieloperoxidase (MPO), após hemólise os leucócitos foram permeabilizados e marcados com anticorpos intracelulares por 30 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. A população de polimorfonuclear foi determinada usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste ANOVA, (*) $p<0,05$.

Outro produto importante que indica a ativação dos macrófagos é a produção de óxido nítrico, que também participa do balanço redox celular, e pode ser mensurado indiretamente pela avaliação da concentração de nitrito no plasma. Não houve diferença na concentração plasmática de nitrito entre as crianças SZC + e SZC -, e entre suas respectivas mães (Figura 18). Por outro lado, quando avaliamos a atividade da arginase, uma enzima importante na metabolização da L-arginina e característica de macrófagos com perfil de ativação alternativo regulador, encontramos redução de sua atividade nas crianças PRNT+ (Figura 18B), sugerindo que os macrófagos dessas crianças apresentam um perfil sistêmico mais inflamatório.

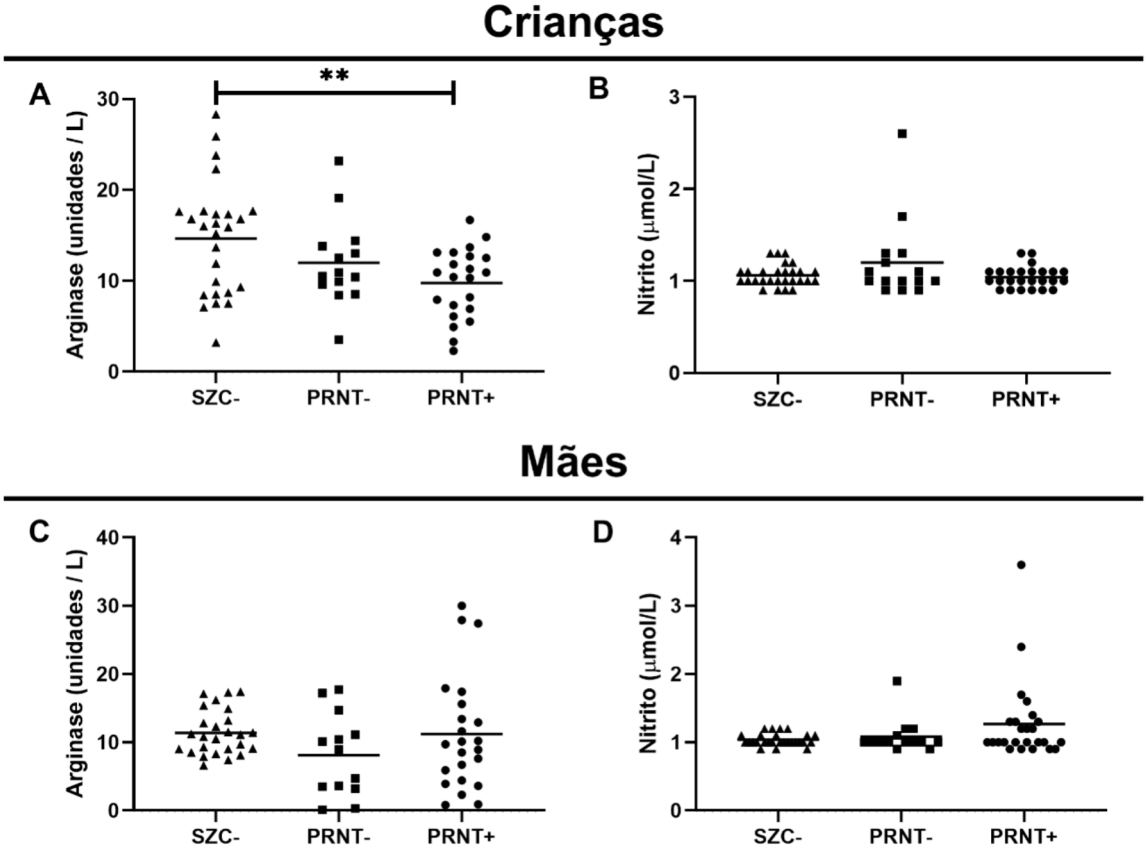


Figura 18. Avaliação da produção de óxido nítrico na SZC. A concentração de nitrito foi determinada em amostra de plasma a partir da Reação de Griess. A atividade da arginase foi avaliada em amostra de plasma utilizando kit comercial. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student, (*) $p<0,05$.

5.4 Associação dos aspectos clínicos da SZC com o perfil imune-inflamatório.

Apesar dos resultados laboratoriais dividirem as crianças em dois grupos, PRNT- e PRNT+, observamos que ambos possuem características clínicas semelhantes e, por isso, nesse tópico analisamos os dados agrupando as crianças de acordo com suas manifestações clínicas, buscando marcadores que indiquem formas graves da síndrome. A classificação levou em consideração os resultados dos exames de imagens de acordo com Mendes et al, 2020. Dessa forma, entre as 42 crianças com síndrome congênita, 14 crianças apresentaram clínica leve/moderada e 25 apresentaram clínica grave.

5.4.1 Associação dos aspectos clínicos com as populações de células e a concentração de citocinas.

Não houve diferença entre as populações de células quando comparadas entre os grupos leve/moderado e grave (Figuras 19 e 20), mas quando avaliamos citocinas, observamos um perfil diferente, tanto nas crianças quanto nas suas respectivas mães.

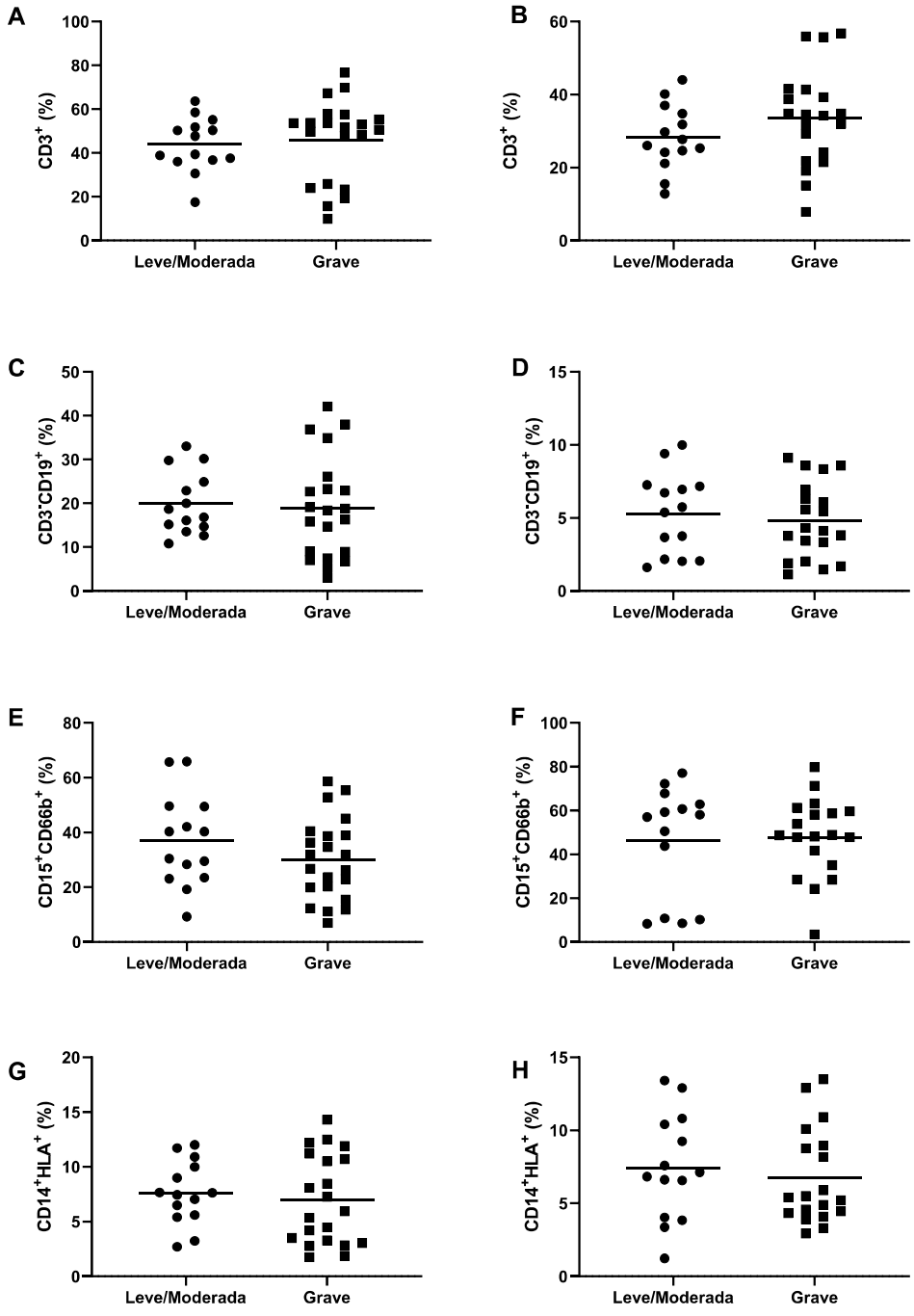


Figura 19. Caracterização fenotípica dos leucócitos de sangue periférico em crianças com síndrome congênita e suas mães. (A, C, E e G) Perfil das populações de leucócitos das crianças; (B, D, F e H) Perfil das populações de leucócitos das mães. As crianças com síndrome congênita foram classificadas de acordo com os exames de tomografia em leve/moderado e grave. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA das crianças sindrômicas, e suas respectivas mães. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. Em seguida foi feita a hemólise e com os leucócitos restantes foi realizada a imunofenotipagem. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student. (*) $p<0,05$. (A e B) Linfócitos T ($CD3^+$); (C e D) Linfócito B ($CD3^-CD19^+$); (E e F) Neutrófilos ($CD15^+CD66b^+$); (G e F) Monócitos ($CD14^+HLA^+$).

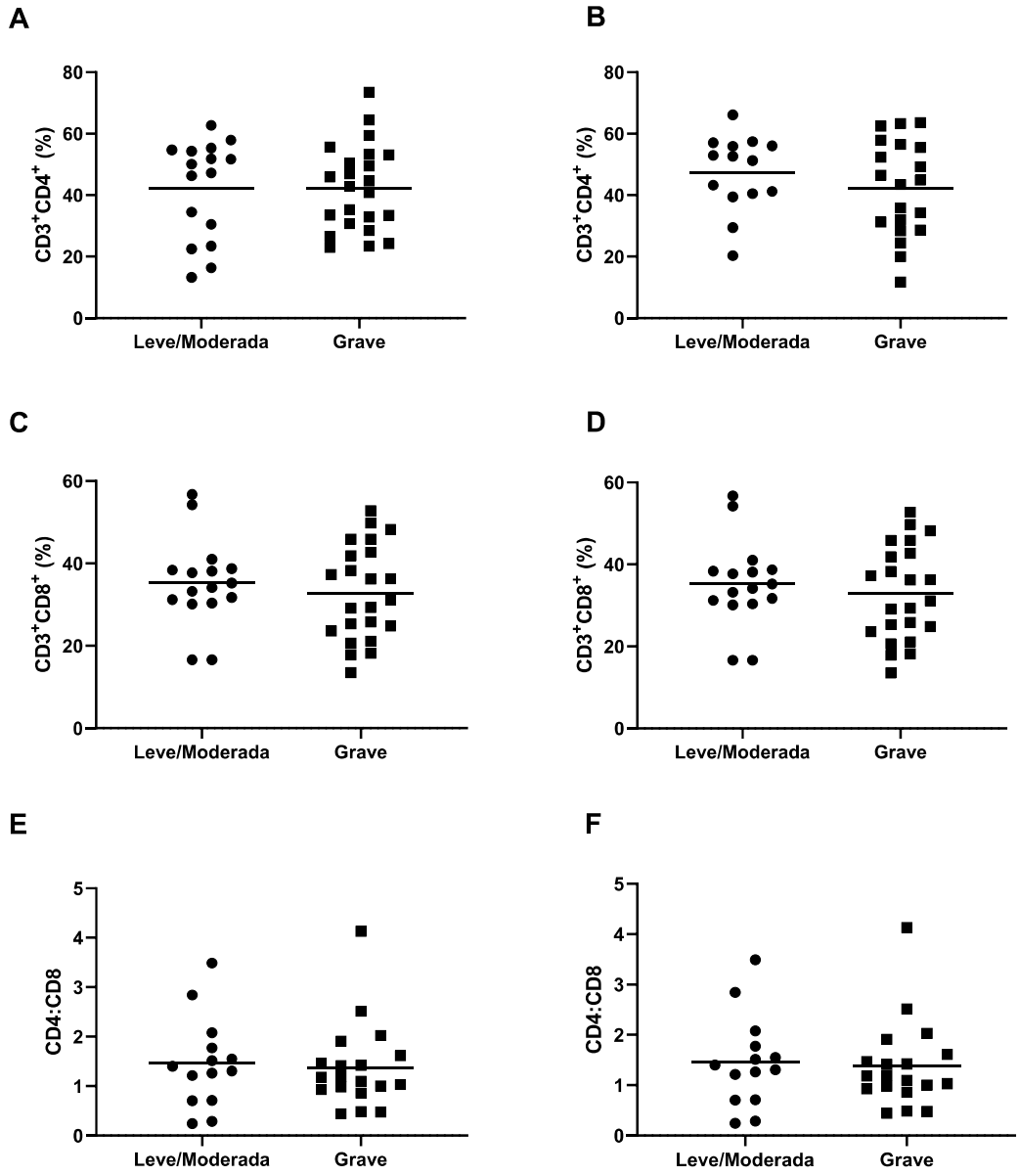


Figura 20. Caracterização fenotípica das subpopulações de linfócitos T em crianças com síndrome congênita e de suas respectivas mães. (A, C e E) Perfil das subpopulações de linfócitos das crianças; (B, D, F), Perfil das subpopulações de linfócitos das mães. As crianças com síndrome congênita foram classificadas de acordo com os exames de tomografia em leve/moderado e grave. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA das crianças sindrômicas, e suas respectivas mães. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. Em seguida foi feita a hemólise e com os leucócitos restantes foi realizada a imunofenotipagem. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student. (*) $p<0,05$.

As crianças com manifestações graves apresentaram maiores concentrações plasmáticas de IFN-γ, IL-6, IL-4 e IL-17a (Figura 21). Em contrapartida, somente IL-6 estava aumentada nas mães de crianças com o espectro grave da síndrome (Figura 22D).

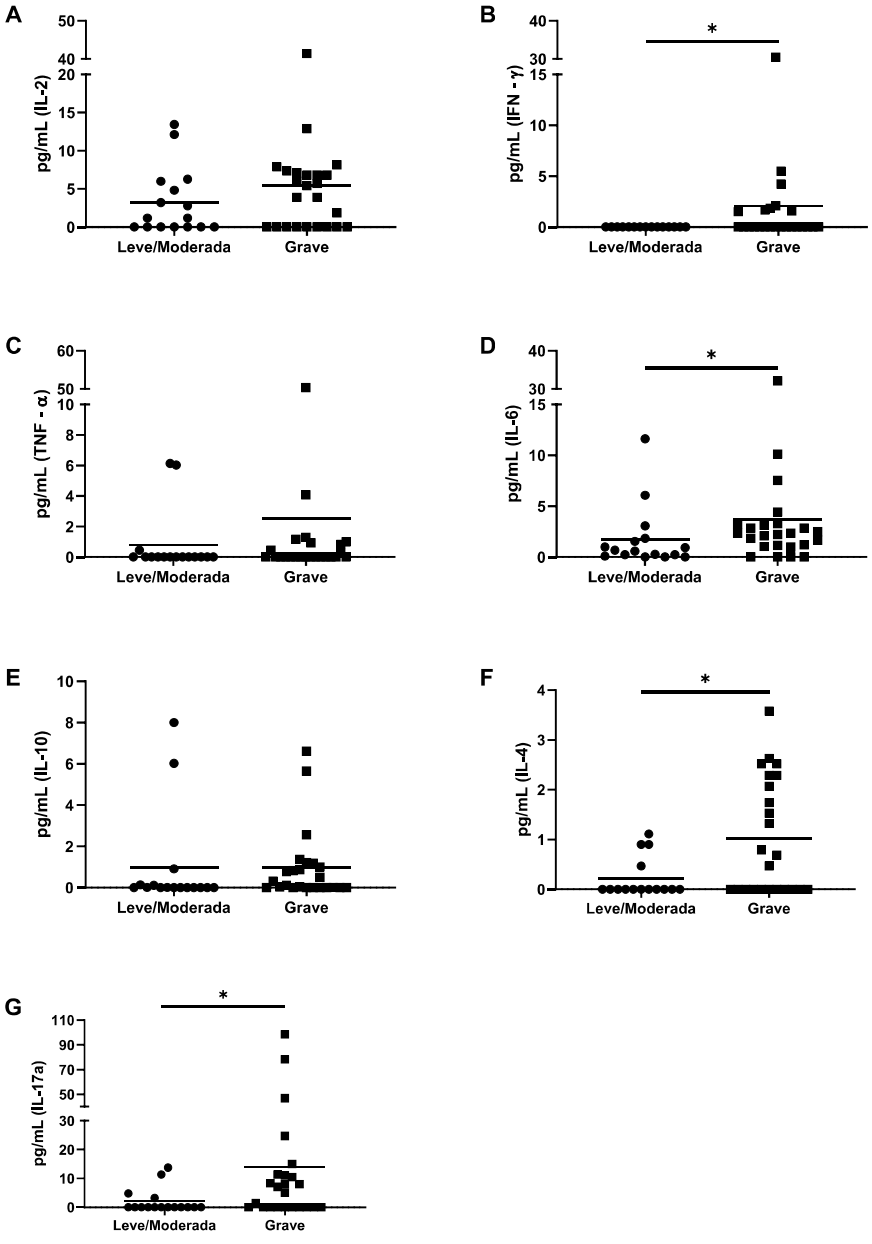


Figura 21. Concentração de citocinas plasmáticas das crianças com síndrome congênita. As crianças com síndrome congênita foram classificadas de acordo com os exames de tomografia em leve/moderado e grave. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA das crianças sindrômicas, e suas respectivas mães. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. As citocinas foram avaliadas pelo método de captura por beads (CBA) de acordo com os procedimentos recomendado pelo fabricante. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student (*) $p<0,05$.

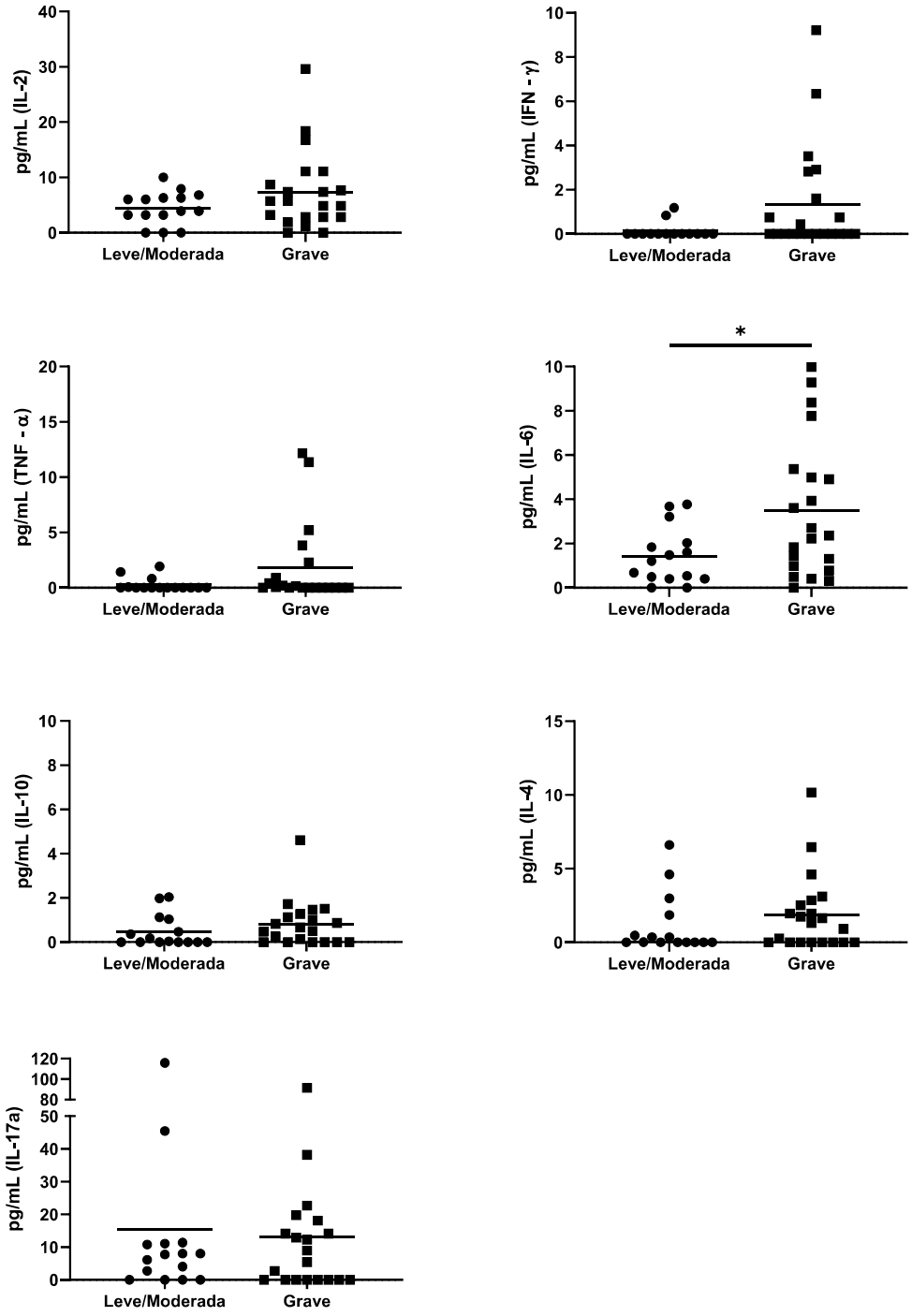


Figura 22. Concentração de citocinas plasmáticas das mães de crianças com síndrome congênita. As crianças com síndrome congênita foram classificadas de acordo com os exames de tomografia em leve/moderado e grave. Foram coletados 5mL de sangue em tubos com EDTA das crianças sindrômicas, e suas respectivas mães. As amostras de sangue foram centrifugadas e o plasma separado e guardado em freezer a -20°C. As citocinas foram avaliadas pelo método de captura por beads (CBA) de acordo com os procedimentos recomendado pelo fabricante. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student (*) $p<0,05$.

5.4.2 Associação dos aspectos clínicos com o estresse oxidativo.

Não encontramos diferença na produção de peróxido de hidrogênio por monócitos e neutrófilos entre os grupos leve/moderado e grave (Figura 23).

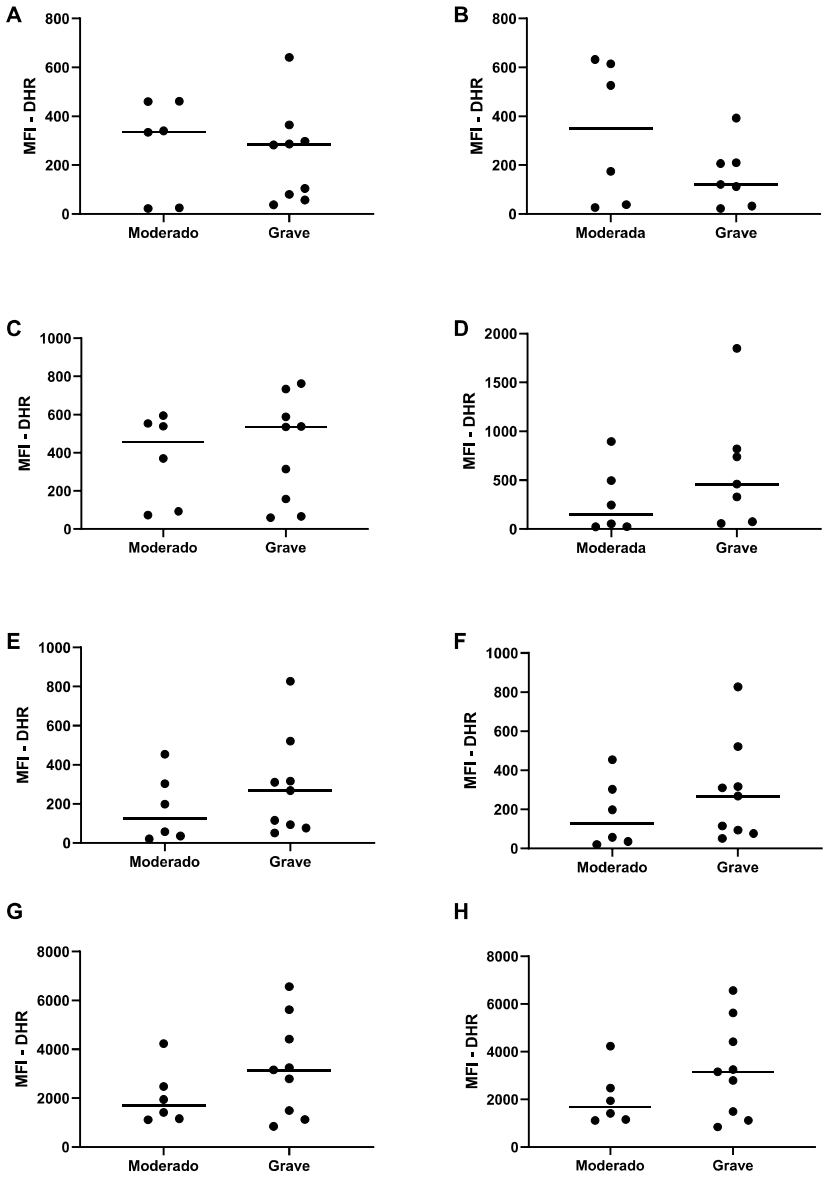


Figura 23. Avaliação da resposta oxidativa das crianças com síndrome congênita e suas mães. (A, C, E e G) Resposta oxidativa das crianças. (B, D, F e H) Resposta oxidativa das mães. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 10 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. As populações de monócitos e neutrófilos foram determinadas usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student (*) $p<0,05$.

Entretanto, na análise pareada entre a produção espontânea e estimulada de peróxido de hidrogênio, observamos que entre as crianças graves a diferença da produção do radical livre é mais acentuada (Figuras 24 e 25) e, por isso, investigamos o delta, ou seja, a diferença entre a produção estimulada e a produção espontânea, no entanto, mas também não encontramos diferença (Figura 26).

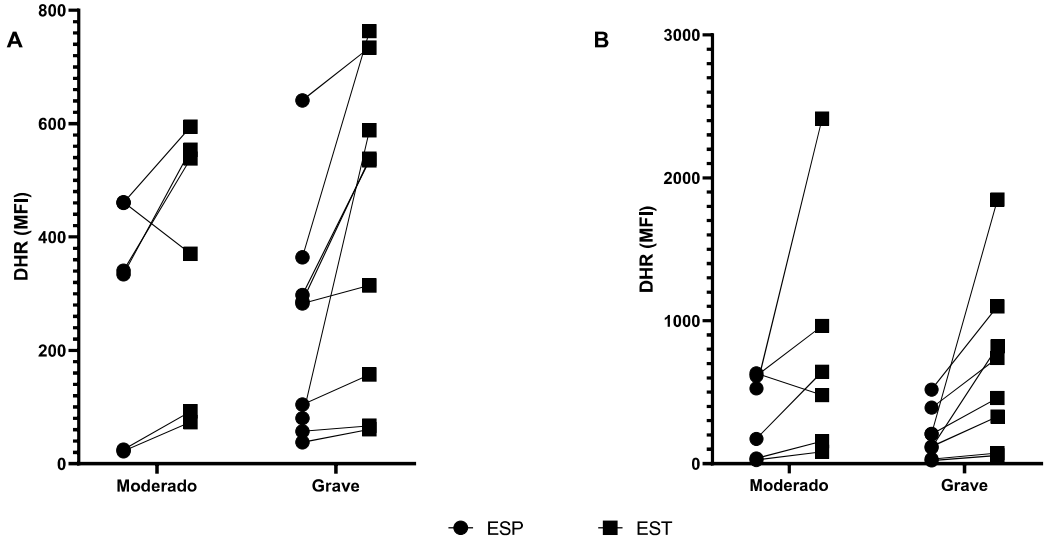


Figura 24. Análise pareada entre a produção espontânea (ESP) e estimulada (EST) de peróxido de hidrogênio em monócitos. (A) Crianças com síndrome congênita e (B) suas mães. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 10 minutos e em seguida com PMA por 30 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. As populações de monócitos foram determinadas usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada.

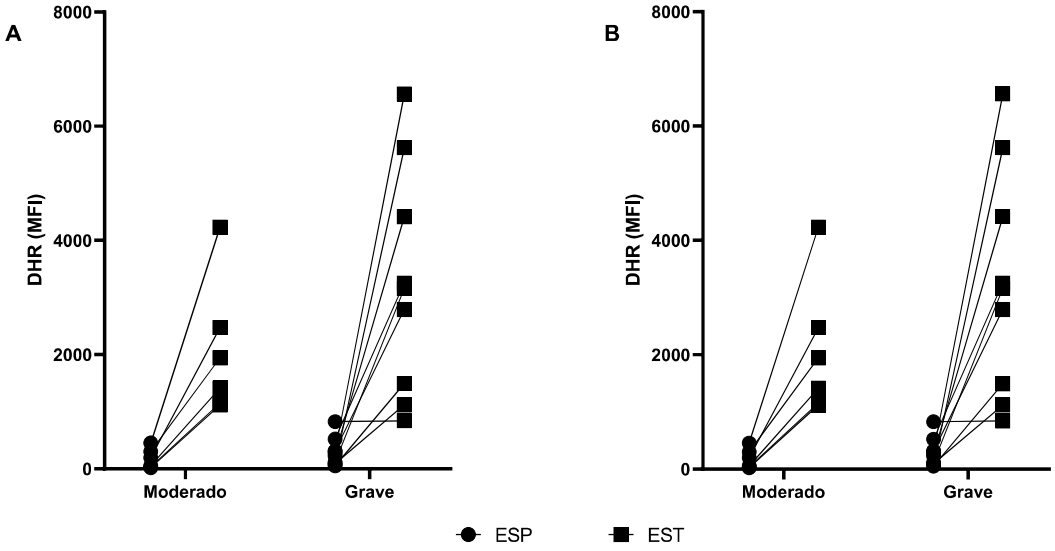


Figura 25. Análise pareada entre a produção espontânea (ESP) e estimulada (EST) de peróxido de hidrogênio em neutrófilos. (A) Crianças com síndrome congênita e (B) suas mães. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 10 minutos, em seguida com PMA por 30 minutos para posterior aquisição de dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. As populações de neutrófilos foram determinadas usando os parâmetros de foward (FSC) versus side scatter (SSC) no software FlowJo e sua média de fluorescência foi calculada.

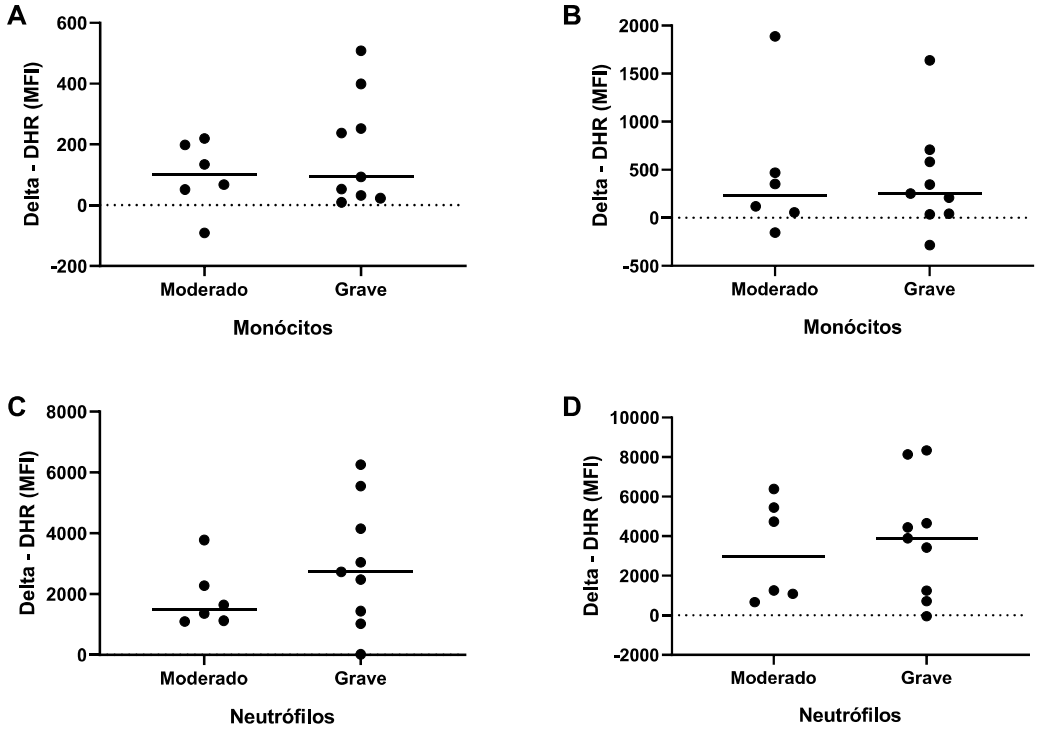


Figura 26. Avaliação do delta da produção de peróxido de hidrogênio. (A e D) Crianças com síndrome congênita e (B e D) suas mães. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 10 minutos e em seguida com PMA por 30 minutos para posterior aquisição dos dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. Após a análise das médias de fluorescência com software FlowJo, foi calculada a diferença entre a produção estimulada e a produção espontânea. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student (*) $p<0,05$.

Todavia, a análise da distribuição dos dados no gráfico do delta da produção em monócitos mostrou que, tanto no grupo leve/moderado, como no grupo grave, os maiores valores pertenciam ao grupo PRNT+. Por isso, para concluir a análise do delta, reagrupamos de acordo o resultado do teste PRNT e detectamos que o grupo PRNT+ possuía um delta maior quando comparado com o grupo PRNT- (Figura 26A).

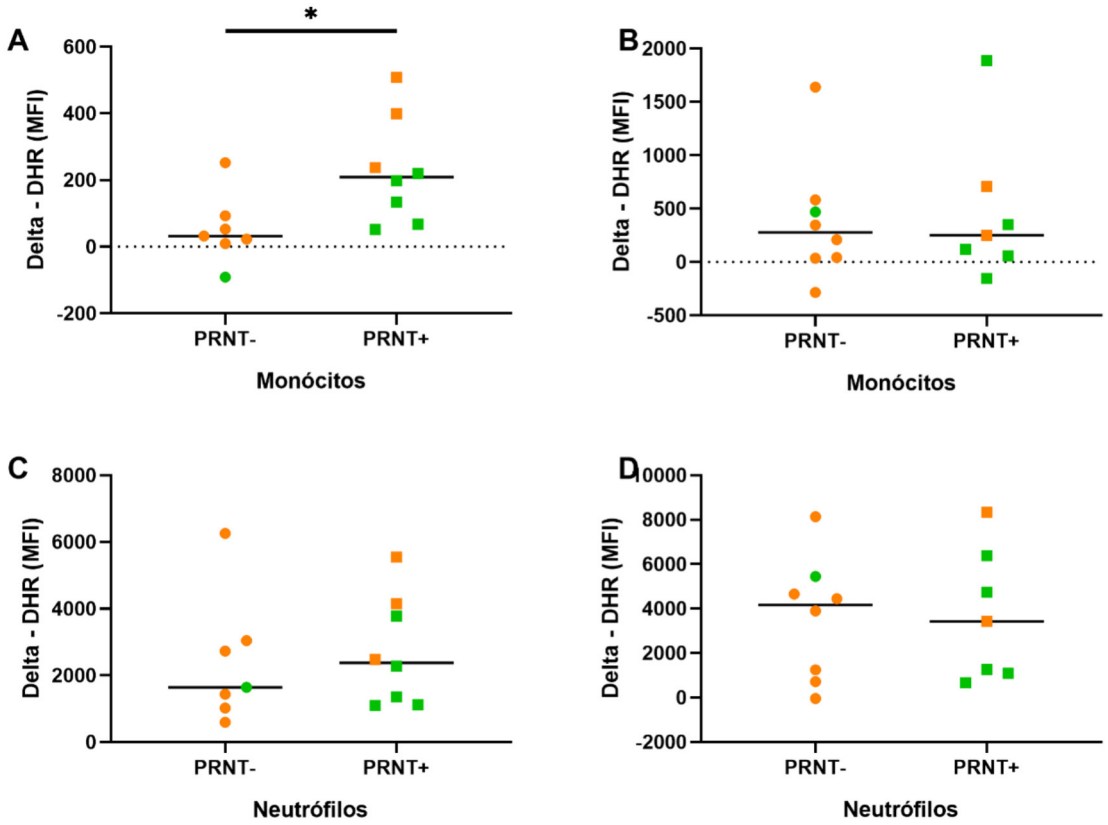


Figura 27. Avaliação do delta da produção de peróxido de hidrogênio. (A e C) Crianças com síndrome congênita e (B e D) suas mães. Para análise da produção de peróxido de hidrogênio, após hemólise os leucócitos foram marcados com a sonda DHR por 10 minutos e em seguida com PMA por 30 minutos para posterior aquisição dos dados em citômetro de fluxo FACS Calibur. Após a análise das médias de fluorescência com software FlowJo, foi calculada a diferença entre a produção estimulada e a produção espontânea. Os dados são expressos em média e a diferença estatística foi verificada utilizando o Teste t-Student (*) $p<0,05$. Leve/moderado (símbolo verde) Grave (símbolo laranja).

.

6. DISCUSSÃO E CONCLUSÃO

Após o surto de microcefalia entre os anos de 2015 e 2016, muitos estudos já evidenciaram a associação entre a infecção pelo vírus Zika durante a gestação e os casos de malformações congênitas. A partir desse contexto, o nosso trabalho investigou os possíveis componentes imunológicos associados a essas malformações. Dessa forma, avaliamos a reposta imunológica das crianças com síndrome da Zika congênita, bem como de suas respectivas mães visando caracterizar o perfil dessa resposta. Nossos dados mostram um perfil pró-inflamatório das crianças com SZC, presença de resposta Th17 acentuada e aumento da resposta redox, associado ao mesmo padrão em suas respectivas mães. Esses resultados constituem uma primeira evidência de que a participação do padrão Th17 e do perfil redox maternos podem estar relacionados com a evolução da SZC nos filhos, os quais mantém o perfil semelhante de resposta.

De forma geral, já está bem descrito como o neurotropismo do vírus Zika provoca uma resposta inflamatória capaz de causar apoptose, redução da proliferação celular e alterações transcricionais que levam alterações corticais (Li et al. 2016). No entanto, nosso estudo mostrou pela primeira vez a correlação entre o perfil imunológico das crianças sindrômicas com o perfil imunológico de suas respectivas mães, levantando a hipótese de que, além da relação com a infecção intraútero pelo vírus Zika, o desenvolvimento da síndrome congênita pode estar atrelado ao perfil imunológico materno herdado pelos filhos.

Cugola e cols (2016) mostraram que o padrão da resposta imunológica é importante para a resolução da infecção e desfecho da prole em camundongos fêmeas de linhagens murinas diferentes. Nesse estudo foi observado que a linhagem com perfil de resposta Th1 era capaz de conter a infecção, evitando a transmissão vertical, pois além de nascerem sem nenhum sinal clínico, o RNA viral não foi detectado nos tecidos da prole, evidenciando que a resposta inflamatória parece exercer um papel protetor no curso da infecção.

A resposta inflamatória, sem mecanismos regulatórios, exerce um papel deletério causando o agravamento do processo patológico (PARDY; RICHER, 2019). De encontro com essa informação, nosso estudo encontrou que um dos mecanismos que pode explicar a ausência da regulação imune na SZC é a diminuição da expressão das moléculas de HLA-DR nos monócitos maternos. Na literatura ainda não existe nenhum relato sobre a associação entre as moléculas de HLA-DR e o desenvolvimento da SCZ, inclusive,

também não há relatos associando-a com a infecção com vírus Zika. No entanto, já foi descrito em outras infecções virais que polimorfismos do gene relacionado às moléculas de HLA podem estar envolvidos com susceptibilidade à infecções pelo vírus da Dengue (ALAGARASU *et al.*, 2013). A diminuição da expressão da molécula de classe II do HLA, pode ter refletido na diminuição do número de linfócito T CD4, e isso é um fator crítico para a composição da resposta antiviral, bem como para a regulação da resposta imunológica. Estes resultados permitem sugerir que as mães que tiveram crianças com SZC não exibiam componentes imunes suficientes para controlar a resposta inflamatória, e dessa forma, causando efeitos deletérios no feto.

Além de apresentarem uma baixa expressão de moléculas HLA-DR, as mães e seus filhos apresentaram aumento de monócitos $CD14^{+}$. Provavelmente, essa condição pode favorecer a imunopatologia da infecção por proporcionar uma quantidade maior de sítio de replicação e persistência viral. A susceptibilidade de monócitos CD14 à infecção pelo Zika vírus foi demonstrada em um estudo *ex vivo* com gestantes saudáveis (FOO *et al.*, 2017), além disso, muitos estudos têm relacionado esta célula com sítios de replicação e sobrevivência viral devido às suas características plásticas nos tecidos e funções dependente de contato célula-célula (NIKITINA *et al.*, 2018).

Brito et al.(2018) demonstraram que o agravamento encontrado nas crianças é devido a persistência do vírus, identificado pelo seu RNA nas crianças, mesmo após 17 meses do nascimento. Nesse caso, o autor associou o número de monócitos com a piora do neonato. Os nossos dados corroboram com essa possibilidade, pois os escores clínicos mais graves (dados não mostrados) foram encontrados nas crianças com a maior população de monócitos, o que também pode estar associado a uma maior persistência do vírus (Partiot; Saudin, 2020) (Anexo).

Os macrófagos, células teciduais derivadas dos monócitos circulantes, são células importantes para o sucesso da infecção por vários vírus e, se tratando do vírus Zika, tanto na pele (nas células de Langherans) como na placenta (células de Hofbauer), os macrófagos são elos importantes na fisiopatologia da infecção (REYES; GOLOS, 2018). Uma população elevada destas células pode favorecer uma rápida disseminação do vírus devido sua migração para grande parte dos tecidos do corpo, além de suas características, como a alta capacidade fagocítica e o contato célula-célula, o que estabelece um canal direto de disseminação entre as células (NIKITINA *et al.*, 2018). Vários autores têm discutido as características destas células que as definem como plausíveis reservatórios virais, pois, após a infecção, o vírus induz alterações na maquinaria celular, levando ao

prolongamento da meia-vida da célula, escape do sistema imune pela diminuição de receptores e mudança na sua polarização. O somatório dessas características favorece a persistência viral, funcionando como um reservatório nos tecidos (NIKITINA *et al.*, 2018).

Um aspecto que tem sido relacionado com a infecção viral em monócitos é o estresse oxidativo (ELBIM *et al.*, 2001; MARINO-MERLO *et al.*, 2019; VALERO *et al.*, 2013). Apesar da limitação do número de crianças na análise da resposta redox, observamos que as crianças SZC+ possuíam maior produção de radicais livres pelos monócitos e eram filhos de mães que possuíam o mesmo perfil. Poucos estudos têm investigado o papel da resposta redox na imunopatologia da infecção do vírus Zika, e até o momento, nosso estudo é o primeiro que traz evidências da participação do estresse oxidativo na Síndrome da Zika Congênita.

Devido a alta reatividade das espécies reativas de oxigênio, geralmente elas estão relacionadas com danos na estrutura da célula, o que explica em parte a gravidade de arboviroses durante a fase aguda está associada com a produção de tais moléculas (OLAGNIER *et al.*, 2014). Mas também, o aumento da resposta oxidativa pode estar relacionada à continuidade da replicação e aumento da liberação de partículas virais. Isso foi demonstrado por Bhaskar et al. (2015) que estudaram o potencial redox em monócitos infectados com o Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV) e observaram que o aumento da resposta antioxidante resultava em resistência à apoptose e maior latência viral. Em contrapartida, a diminuição dessa resposta conduzia a reativação da replicação viral e continuação da infecção.

Até o momento, discorremos sobre uma população de monócitos com uma alta produção de radicais livres, possivelmente associada com sua condição clínica. De fato, quando devidamente controlados, os ROS são importantes sinalizadores celulares envolvidos na diferenciação, proliferação e morte celular. Entretanto, a alteração do estado redox pelo acúmulo de ROS/RNI pode conduzir ao desenvolvimento de patologias embrionárias, como abortos e restrição do crescimento intrauterino (PUTTABYATAPPA *et al.*, 2020).

Além do aumento da produção de radicais livres, nossos resultados trazem evidências que essa resposta está associada a monócitos com perfil pró-inflamatório M1, uma vez que as crianças tiveram diminuição da atividade da arginase. Essa situação ocorre devido ao aumento da atividade da enzima Óxido Nítrico Sintetase (INOs), o que direciona a polarização para ativação de monócitos pró-inflamatórios do tipo M1

(TEIXEIRA *et al.*, 2020). Entretanto, estes resultados conflitam com Azevedo et al, (2018) que demonstraram que amostras de tecidos neurais de casos fatais de SZC apresentaram um infiltrado inflamatório com necrose, apoptose e prevalência de macrófagos M2. Provavelmente, devido aos perfis de resposta terem sido caracterizados em locais diferentes, um no sangue periférico, e outro no tecido, tenhamos encontrado essa diferença, pois dependendo da fase que se encontra o processo inflamatório, o macrófago tecidual tende a ter um perfil mais resolutivo (ORZALLI *et al.*, 2018). Diferente dos filhos, as mães não apresentaram diminuição da atividade da arginase e também não apresentavam nenhum processo inflamatório em curso, como ocorria nos filhos com a síndrome congênita e, por isso a polarização poderia ser menos ++evidente.

A avaliação da concentração de nitrito plasmático (método indireto de mensurar o óxido nítrico) mostrou que não há diferença entre os grupos de crianças, nem entre suas mães. Provavelmente, porque o óxido nítrico (NO), além de ser um radical com meia-vida muito curta, ele também pode reagir com uma variedade de moléculas levando a produção de outras espécies reativas de nitrogênio como o peroxinitrito ($ONOO^-$), o trióxido de dinitrogênio (N_2O_3), ou íon nitrônio ($NO2^+$) (IGNARRO, 1990).

Uma possível explicação para as diferenças mais evidentes durante a gestação, uma vez que, apesar da supressão da resposta imune materna durante a gestação, a presença do vírus Zika na placenta, como já demonstrado por outros estudos, causa uma resposta inflamatória crônica (Noronha et al. 2016), e talvez, por essa razão a resposta imune materno-fetal polarize para um perfil mais inflamatório, com o aumento da produção de peróxido de hidrogênio, como demonstrado no nosso estudo.

Todavia, apesar de termos encontrado aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio nas células, a atividade da SOD não diferiu entre as crianças CZS+, nem entre suas mães. Durante a infecção pelo vírus da Dengue, ocorre a ativação do complexo enzimático NADPH oxidase, um importante produtor de ânio superóxido (OLAGNIER *et al.*, 2014), o qual é reduzido pela enzima SOD em peróxido de hidrogênio (GLASAUER; CHANDEL, 2013). Nossos resultados sugerem o envolvimento de outras vias oxidativas no aumento dos níveis de peróxido de hidrogênio. Enzimas como glutationa e catalase também têm demonstrado ter relação com o aumento da produção dessa molécula durante infecções virais, sendo um importante objeto de estudo para próximas investigações (BHASKAR *et al.*, 2015; VALERO *et al.*, 2013).

Juntos, nossos resultados reforçam a ideia da relação da persistência do perfil inflamatório com a gravidade da SZC. Embora não existam relatos que relacionem a

resposta redox com SZC, existem dados que evidenciam a associação entre o desequilíbrio redox e o curso da infecção ocasionada por alguns Flavivirus, com o vírus da hepatite C e o vírus da Dengue, favorecendo sua persistência e replicação (IVANOV *et al.*, 2013; OLAGNIER *et al.*, 2014). Nossos dados corroboram com essas informações, pois crianças com PRNT+ apresentaram um potencial redox maior do que aquelas com PRNT-. Apesar de não avaliarmos a carga viral, mas é plausível pensar que um perfil mais oxidativo tornou o ambiente mais propício para a persistência e cronicidade da infecção. Acreditamos que o fato de os indivíduos serem mais responsivos aos estímulos oxidativos, pode promover persistência viral, resultando em testes PRNT+.

De fato, o PRNT apesar de ser o teste recomendado pelo CDC (*Center for Disease Control and Prevention*) para o diagnóstico da Zika, ele apresenta limitações, como por exemplo, as reações cruzadas entre os peptídeos de outros arborvírus. Além disso, recentemente Ribeiro cols (2020) usando a mesma coorte do nosso estudo, observou que as crianças com PRNT- possuíam um perfil clínico muito semelhante do grupo com SZC e, por isso, cogitaram a possibilidade de tais crianças terem o diagnóstico falso-negativo. Os autores listaram três estratégias que o vírus Zika pode apresentar para não ser detectado: diminuir a viremia, alojar-se no sistema nervoso, ou mesmo diminuir a sua replicação, e por meio dessas vias evadir-se do sistema imune. (Ribeiro et al. 2020).

Mesmo com associação tardia com o vírus Zika, os estudos realizados nesse momento são relevantes para entendermos o repertório da reposta imunológica das mães e relacioná-lo com o desfecho de seus filhos. Nesse sentido, encontramos que as populações de células imunes das crianças com SZC e suas respectivas mães estão correlacionadas positivamente, o que não acontece com o grupo de crianças assintomáticas. Em um estudo que também comparou a resposta imune entre crianças sem SCZ e com SZC, todas crianças filhas de mães com história de infecção na gravidez, demonstrou que tanto crianças com SZC, como também suas mães possuíam células T CD4 que produziam pouco IFN-γ quando estimuladas com peptídeos do vírus Zika (BADOLATO-CORRÊA *et al.*, 2021). Além de corroborar a correlação entre as populações de células, esses autores também reforçam nossa hipótese de que a diminuição da expressão de HLA na superfície de monócitos pode ser um mecanismo que leve a baixa regulação das células T CD4, e isso poderia ser a causa da diminuição da produção de IFN-γ.

O estudo acima não encontrou diferença da produção de IFN-γ entre as células T CD8, provavelmente porque a atividade citotóxica e pró-inflamatória estivesse mais evidente nos estágios iniciais da doença. Entretanto, nossa análise revelou que crianças com PRNT-, porém sindrômicas, apresentaram aumento da população de células T CD8 e aumento da citocina IFN-γ. Estas células estão associadas com uma resposta protetora durante a infecção viral por dispor de vários mecanismos, tais como, citotoxicidade direta e produção de citocinas pró-inflamatórias que inclui o IFN-γ que está mais presente nos estágios iniciais da doença (KURACHI, 2019).

Os estudos ainda não elucidaram o papel do linfócito T CD8 na patogênese da SZC, apontando papéis antagônicos durante a infecção, tanto em modelos animais, como em pacientes (PARDY; RICHER, 2019). Em pesquisas utilizando camundongos resistentes da linhagem C57/Bl6 observaram que os animais infectados desenvolveram uma resposta robusta de CD8, gerando potenciais células de memórias (CUGOLA *et al.*, 2016). Além disso, outro estudo registrou um infiltrado de células CD8 no tecido cerebral, o que pode estar relacionado a uma reposta menos grave nesse modelo (HUANG *et al.*, 2017). Em contrapartida, foi mostrado também que o infiltrado de células CD8 no sistema nervoso central está relacionado com a neurodegeneração, sendo menos evidente em camundongos com ausência de IFN, apontando a participação desses componentes no progresso das lesões nevosas (MANANGEESWARAN; IRELAND; VERTHELYI, 2016).

Não só em modelos animais, mas o papel das células CD8 também é controverso em pacientes. Em biópsias de tecido cerebral de casos fatais de crianças que nasceram com microcefalia havia um intenso infiltrado inflamatório com aumento da expressão de marcadores de linfócitos T CD4 e CD8 (AZEVEDO *et al.*, 2018). Dessa forma, mesmo sendo bem elucidado o papel de linfócitos T CD8 frente a infecções virais, o estímulo crônico pode desencadear uma desregulação da resposta citotóxica e levar a quadro mais graves da doença. De forma intrigante, as crianças PRNT- também apresentaram quadros mais graves da síndrome congênita.

Diante disso, é razoável admitir que o aumento de linfócitos T CD8 incitou uma resposta funcional, visto pelo aumento de IFN-γ, a qual pode ter reduzido a carga viral e, portanto, não foi detectada no teste de redução de placas, mas ainda assim, as células também podem estar relacionadas com o quadro clínico mais grave. Tomando as informações em conjunto, é possível que a caracterização clínica do paciente possua uma

capacidade maior de diferenciar o grupo de crianças com SZC, visto que o perfil de resposta imune das crianças pode interferir no resultado do teste de redução de placas.

Outro aspecto do perfil imunológico das mães que pode estar relacionado com o desenvolvimento da SZC é a diminuição de células B. Apesar de não podermos determinar a frequência das populações de células no momento da gestação para relacionarmos com o desfecho do recém-nascido, termos encontrado essa particularidade nos faz sugerir que existem fatores imunológicos maternos associados com a propensão para o desenvolvimento da síndrome congênita. Vyas et al (2019) acompanharam um grupo de mães que foram positivas para o antígeno do vírus da Hepatite B, um vírus que pertence a mesma família do vírus Zika, e viram que as mães em que acontecia a transmissão vertical do vírus exibiam uma frequência menor de linfócitos B no sangue periférico, o que estava associado com baixos níveis de IL-21 sérico. Dessa forma, os autores demonstraram que fatores imunes maternos estão associados com o desfecho da infecção congênita.

As mães das crianças sindrômicas também apresentaram aumento da frequência de neutrófilos no plasma. Geralmente essas células estão envolvidas em infecções bacterianas e fúgicas, e pouco se sabe sobre seu papel durante infecções virais, no entanto, o seu potencial inflamatório pode causar extensas lesões teciduais durante progresso da resposta imune (NAUMENKO *et al.*, 2018). Um dos mecanismos de lesão tecidual é a produção de espécies reativas de oxigênios, que se apresentou elevada nos neutrófilos das mães, provavelmente pela redução da enzima MPO.

Nossos dados até o momento apontam que a síndrome congênita possui um caráter imune-inflamatório composto tanto por mecanismos regulatórios deficientes, como também, por componentes pró-inflamatórios. De fato, quando avaliamos de forma funcional a resposta imune observamos que tanto mães e filhos sindrômicos possuem aumento de citocinas IL-17a, uma citocina que induz ações deletérias devido a resposta exacerbada (AMATYA; GARG; GAFFEN, 2017). Provavelmente a ativação imune materna, marcada pelo aumento de citocinas IL-17 e IL-6, pode ser o gatilho imunológico para desencadear as lesões no sistema nervoso central.

As infecções virais podem modular a resposta imune durante a gestação induzindo o aumento dos níveis de citocinas inflamatórias (BARROS *et al.*, 2018; JAIN *et al.*, 2013; JAIYEN *et al.*, 2009b). Ornelas e cols. mostraram uma miscelânea de citocinas inflamatórias presentes no fluido amniótico de 9 gestante que tiveram Zika e filhos com SZC. É possível que a ativação do sistema imune no ambiente uterino seja um dos

primeiros fatores que pode interferir no desenvolvimento do feto. Geralmente citocinas como, TNF-α, IFN-γ, IL-1β estão relacionadas com efeitos teratogênicos; TNF-α pode induzir defeito no tubo neural; IFN-γ pode estar relacionada com o bloqueio do desenvolvimento da placenta após a infecção com Zika vírus; IL-1β pode induzir partos pré-maturo (YOCKEY; IWASAKI, 2018).

Com relação ao vírus Zika, foi demonstrado que ele aumenta a expressão da citocina IL-17 somente nas gestantes (CAMACHO-ZAVALA *et al.*, 2021; ORNELAS *et al.*, 2017). Em um estudo com infecção em mulheres não gestantes o vírus foi capaz de aumentar os níveis de citocinas como IL-6, IL-2 e IFN-γ, no entanto, quando a infecção ocorre em mulheres gestantes, a infecção induz a expressão de IL-10, IL-6, IL-17, TNF-α, IFN-α e IFN-γ (CAMACHO-ZAVALA *et al,* 2021). Mesmo durante a fase aguda da febre Zika em pacientes adultos não foi encontrado a presença de IL-17 (BARROS *et al.* 2018), mas a interleucina 17 foi detectada no líquido amniótico, cerca de 19 vezes mais em relação ao controle, de gestantes infectadas com Zika, e que os fetos desenvolveram microcefalia (ORNELAS *et al*. 2017). Dessa forma, nosso estudo mostra a permanência do perfil inflamatório nas mães, que provavelmente foi induzido pelo vírus durante a gravidez, o qual está correlacionado com o perfil inflamatório dos filhos, sugerindo que componentes maternos podem ser transferidos para o feto.

Em modelos experimentais de ativação imune materna com camundongos, foi demonstrado que infecções virais durante a gestação levam a uma ativação imune patológica dependente da produção de IL-17 materna pelas células Th17 da decídua e da placenta. A IL-17 produzida foi transferida para o feto, o qual apresentou um desenvolvimento cortical atípico que estava associado com o aumento da expressão de receptores de IL-17 no tecido cerebral induzidos pela injeção de RNA fita dupla (CHOI *et al.* 2016). Uma resposta inflamatória crônica sustentada pelos altos níveis de IL-17 pode ser a causa da piora clínica no curso da SZC. E, somado aos níveis elevados de IL-17a, as mães de filhos sindrômicos também apresentaram índices elevados de IL-6, uma citocina que atua como cofator na diferenciação de linfócitos Th17, assim como, também provocar alterações no desenvolvimento do cérebro (MIHARA *et al.*, 2011; SMITH *et al.*, 2007).

Além dos efeitos das citocinas durante a gestação, os bebês que foram expostos à ativação imune materna apresentam uma sensibilidade maior aos estímulos inflamatórios (ROSE *et al.*, 2017). O estudo citado acompanhou durante 4 anos a prole de macacas que

receberam pela via intraperitoneal [poli (I:C)], o qual mimetiza uma infecção viral. No primeiro ano, a prole apresentou elevada produção de citocinas inflamatórias, como IL-1β, IL-6 e IL-12p40. Já com 4 anos, a prole continuou com uma produção elevada de IL-1β, mas também, apresentou produção de citocinas do padrão Th2, no caso, IL-4 e IL-13. Em outro estudo experimental com camundongos, os autores observaram que, após a ativação imune materna pela injeção de [poli (C:I)], uma segunda injeção no pós-natal induziu altos níveis de IL-6, IL-17a e IFN-γ, além de causar necrose hepática e falha na resposta da proteína não enovelada (SHIMIZU *et al.*, 2021). Esses estudos ressaltam que o contato com o estímulo inflamatório no período pré-natal pode gerar na pessoa um padrão de resposta inflamatória mais exacerbado, acarretando danos que se manifestam posteriormente.

Diante disso, podemos levantar que o desenvolvimento da SZC envolve o efeito neurotrópico do vírus, acarretando apoptose e diminuição da capacidade proliferativa das células nervosas, como já demonstrado por outros autores (LI *et al*, 2016), mas também pode ser produto dos efeitos teratogênicos do de citocinas produzidas pela ativação imune patológica nas mães durante a infecção, e por fim, devido a ativação imune materna, a persistência do perfil inflamatório, que no nosso estudo foi percebido pelos persistência de IL-17 nos filhos e nas mães, mesmo após 20 meses. Uma possível hipótese que respalde os níveis elevados desta citocina, é a permanência de células Th17 de memória residente no tecido (Trm17), a qual é caracterizada pela produção de citocinas com alta capacidade patogênica, como já caracterizada em outros contextos (KREBS *et al.*, 2020; VESELY *et al.*, 2019; ZHAO *et al.*, 2021).

As primeiras associações feitas entre a ativação imune materna com o aparecimento de desordens neurológicas partiram da observação de que crianças que manifestavam autismo, ou esquizofrenia, tinham histórico de exposição a infecção durante a gestação, como por exemplo, ao vírus da influenza e a rubéola (BROWN, 2012). Com relação ao vírus Zika, já é possível observar em modelos murinos nas fases da idade equivalentes a adolescência humana as alterações comportamentais na prole com exposição intrauterina ao vírus (Ireland et al. 2020). Dessa forma, é razoável sugerirmos que a SZC pode estar relacionado com os processos de ativação imune materna dependente de IL-17.

Dessa forma, nossos resultados mostram que o perfil imunológico pró-inflamatório materno está associado com o perfil dos filhos com SZC, provavelmente atuando com gatilho para o estabelecimento e/ou progressão da síndrome nesse grupo. O fato dos

indivíduos com SZC apresentarem aumento dos estímulos oxidativos, pode predispô-los a sequelas mais graves devido ao dano provocado pelo excesso de radicais livres. No futuro, essa via pode constituir importante alvo na terapêutica, possibilitando o controle de efeitos deletérios nas infeções congênitas.

A presença de marcadores celulares e solúveis da resposta inflamatória, mesmo após meses do nascimento, indicam que a maturação do sistema imunológico dessas crianças foi afetada pela presença do vírus e/ou resposta materna. Dessa forma, a análise imunológica desses pacientes deve ser associada à avaliação clínica para construção de um modelo prognóstico para SZC, bem como para outras infecções congênitas que podem levar à desregulação imunológica e inflamação persistente.

7. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nosso trabalho destacou que a ativação imune materna induzida pela infecção viral pode interferir no desenvolvimento da prole. Aparentemente, além do efeito do vírus sobre o desenvolvimento neurológico, o componente imune-inflamatório também exerce um papel no processo de malformação do feto. Além disso, os resultados foram proveitosos, pois abrem novas frentes de investigações sobre os fatores que podem predispor a malformação do feto provocada, não só pelo vírus Zika, mas também por outros agentes etiológicos, pois o perfil de resposta identificado em nossos resultados pode ser aplicado em outros contextos. Logo, a caracterização imunológica das mães pode ajudar no acompanhamento pré-natal quando se tratar de casos de infecções virais que podem conduzir a uma hiperativação imune e causar sequelas no feto, antecipando medidas intervencionistas, e melhorando o prognóstico da criança.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ACOSTA-AMPUDIA, Yeny; MONSALVE, Diana M.; CASTILLO-MEDINA, Luis F.; RODRÍGUEZ, Yhojan; PACHECO, Yovana; HALSTEAD, Susan; WILLISON, Hugh J.; ANAYA, Juan Manuel; RAMÍREZ-SANTANA, Carolina. Autoimmune neurological conditions associated with zika virus infection. **Frontiers in Molecular Neuroscience**, vol. 11, no. April, 2018. https://doi.org/10.3389/fnmol.2018.00116.

AGRELLI, Almerinda; DE MOURA, Ronald Rodrigues; CROVELLA, Sergio; BRANDÃO, Lucas André Cavalcanti. ZIKA virus entry mechanisms in human cells. **Infection, Genetics and Evolution**, vol. 69, p. 22–29, 1 Apr. 2019. DOI 10.1016/j.meegid.2019.01.018. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1567134818306427. Accessed on: 15 Oct. 2021.

AL-ALIMI, Abdullah Ahmed; ALI, Syed A.; AL-HASSAN, Faisal Muti; IDRIS, Fauziah Mohd; TEOW, Sin Yeang; MOHD YUSOFF, Narazah. Dengue Virus Type 2 (DENV2)-Induced Oxidative Responses in Monocytes from Glucose-6-Phosphate Dehydrogenase (G6PD)-Deficient and G6PD Normal Subjects. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 8, no. 3, p. e2711, 13 Mar. 2014. DOI 10.1371/journal.pntd.0002711. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0002711. Accessed on: 12 Jul. 2017.

ALAGARASU, K; MULAY, A.P; SINGH, R; GAVADE, V.B; SHAH, P.S; CECILIA, D. Association of HLA-DRB1 and TNF genotypes with dengue hemorrhagic fever. **Human Immunology**, vol. 74, no. 5, p. 610–617, 1 May 2013. DOI 10.1016/j.humimm.2013.01.027. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0198885913000384?via%253Dihub. Accessed on: 1 Oct. 2017.

AMATORE, Donatella; SGARBANTI, Rossella; AQUILANO, Katia; BALDELLI, Sara; LIMONGI, Dolores; CIVITELLI, Livia; NENCIONI, Lucia; GARACI, Enrico; CIRIOLO, Maria Rosa; PALAMARA, Anna Teresa. Influenza virus replication in lung epithelial cells depends on redox-sensitive pathways activated by NOX4-derived ROS. **Cellular Microbiology**, vol. 17, no. 1, p. 131–145, 2015. https://doi.org/10.1111/cmi.12343.

AMATYA, Nilesh; GARG, Abhishek V; GAFFEN, Sarah L. IL-17 Signaling: The Yin and the Yang. **Trends in immunology**, vol. 38, no. 5, p. 310–322, May 2017. https://doi.org/10.1016/j.it.2017.01.006.

AZEVEDO, Raimunda S. S.; DE SOUSA, Jorge R.; ARAUJO, Marialva T F; MARTINS FILHO, Arnaldo J.; DE ALCANTARA, Bianca N.; ARAUJO, Fernanda M. C.; QUEIROZ, Maria G. L.; CRUZ, Ana C. R.; VASCONCELOS, Beatriz H Baldez; CHIANG, Jannifer O.; MARTINS, Lívia C.; CASSEB, Livia M. N.; DA SILVA, Eliana V.; CARVALHO, Valéria L.; VASCONCELOS, Barbara C Baldez; RODRIGUES, Sueli G.; OLIVEIRA, Consuelo S.; QUARESMA, Juarez A. S.; VASCONCELOS, Pedro F. C. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. **Scientific reports**, vol. 8, no. 1, p. 1, 8 Dec. 2018. DOI 10.1038/s41598-017-17765-5. Available at: http://www.nature.com/articles/s41598-017-17765-5.

AZEVEDO, Raimunda S.S.; ARAUJO, Marialva T.; MARTINS FILHO, Arnaldo J.; OLIVEIRA, Consuelo S.; NUNES, Bruno T.D.; CRUZ, Ana C.R.; NASCIMENTO, Ana G.P.A.C.; MEDEIROS, Rita C.; CALDAS, Cezar A.M.; ARAUJO, Fernando C.; QUARESMA, Juarez A.S.; VASCONCELOS, Barbara C.B.; QUEIROZ, Maria G.L.; DA ROSA, Elizabeth S. Travassos; HENRIQUES, Daniele F.; SILVA, Eliana V.P.; CHIANG, Jannifer O.; MARTINS, Lívia C.; MEDEIROS, Daniele B.A.; … VASCONCELOS, Pedro F.C. Zika virus epidemic in Brazil. I. Fatal disease in adults: Clinical and laboratorial aspects. **Journal of Clinical Virology**, vol. 85, p. 56–64, Dec. 2016. DOI 10.1016/j.jcv.2016.10.024. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1386653216305856. Accessed on: 28 Jun. 2017.

BADOLATO-CORRÊA, Jessica; CARVALHO, Fabiana Rabe; PAIVA, Iury Amancio; FAMILIAR-MACEDO, Débora; DIAS, Helver Gonçalves; PAUVOLID-CORRÊA, Alex; FERNANDES-SANTOS, Caroline; LIMA, Monique da Rocha Queiroz; GANDINI, Mariana; SILVA, Andréa Alice; BAETA CAVALCANTI, Silvia Maria; DE OLIVEIRA, Solange Artimos; DE OLIVEIRA VIANNA, Renata Artimos; DE AZEREDO, Elzinandes Leal; CARDOSO, Claudete Aparecida Araújo; GRIFONI, Alba; SETTE, Alessandro; WEISKOPF, Daniela; DE-OLIVEIRA-PINTO, Luzia Maria. Differential Longevity of Memory CD4 and CD8 T Cells in a Cohort of the Mothers With a History of ZIKV Infection and Their Children. **Frontiers in Immunology**, vol. 12, no. February, p. 1–17, 2021. https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.610456.

BARBI, Ludovica; COELHO, Antonio Victor Campos; ALENCAR, Luiz Cláudio Arraes de; CROVELLA, Sergio. Prevalence of Guillain-Barré syndrome among Zika virus infected cases: a systematic review and meta-analysis. **Brazilian Journal of Infectious Diseases**, vol. 22, no. 2, p. 137–141, 2018. DOI 10.1016/j.bjid.2018.02.005. Available at: https://doi.org/10.1016/j.bjid.2018.02.005.

BARROS, Jéssica Barletto de Sousa; SILVA, Paulo Alex Neves da; KOGA, Rosemary de Carvalho Rocha; GONZALEZ-DIAS, Patrícia; CARMO FILHO, José Rodrigues; NAGIB, Patrícia Resende Alo; COELHO, Verônica; NAKAYA, Helder I; FONSECA, Simone Gonçalves; PFRIMER, Irmtraut Araci Hoffmann. Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations . **Frontiers in Immunology** , vol. 9, p. 821, 2018. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.00821.

BHASKAR, Ashima; MUNSHI, Mohamed Husen; KHAN, Sohrab Zafar; FATIMA, Sadaf; ARYA, Rahul; JAMEEL, Shahid; SINGH, Amit. Measuring glutathione redox potential of HIV-1-infected macrophages. **Journal of Biological Chemistry**, vol. 290, no. 2, p. 1020–1038, 2015. https://doi.org/10.1074/jbc.M114.588913.

BRASIL, Patrícia; PEREIRA, José P.; MOREIRA, M Elisabeth; RIBEIRO NOGUEIRA, Rita M; DAMASCENO, Luana; WAKIMOTO, Mayumi; RABELLO, Renata S; VALDERRAMOS, Stephanie G; HALAI, Umme-Aiman; SALLES, Tania S; ZIN, Andrea A; HOROVITZ, Dafne; DALTRO, Pedro; BOECHAT, Marcia; RAJA GABAGLIA, Claudia; CARVALHO DE SEQUEIRA, Patrícia; PILOTTO, José H; MEDIALDEA-CARRERA, Raquel; COTRIM DA CUNHA, Denise; … NIELSEN-SAINES, Karin. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, vol. 375, no. 24 ed. 2016/03/04, p. 2321–2334, 15 Dec. 2016. DOI 10.1056/NEJMoa1602412. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26943629.

BRITO, Carlos A A; HENRIQUES-SOUZA, Adélia; SOARES, Cynthia R P; CASTANHA, Priscila M S; MACHADO, Laís C; PEREIRA, Mylena R; SOBRAL, Mariana C M; LUCENA-ARAUJO, Antonio R; WALLAU, Gabriel L; FRANCA, Rafael F O. Persistent detection of Zika virus RNA from an infant with severe microcephaly -- a case report. **BMC Infectious Diseases**, vol. 18, no. 1, p. 388, 2018. DOI 10.1186/s12879-018-3313-4. Available at: https://doi.org/10.1186/s12879-018-3313-4.

BROWN, Alan S. Epidemiologic studies of exposure to prenatal infection and risk of schizophrenia and autism. **Developmental Neurobiology**, Hoboken, vol. 72, no. 10, p. 1272–1276, Oct. 2012. DOI 10.1002/dneu.22024. Available at: https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/dneu.22024.

CAMACHO-ZAVALA, Elizabeth; SANTACRUZ-TINOCO, Clara; MUÑOZ, Esteban; CHACÓN-SALINAS, Rommel; SALAZAR-SANCHEZ, Ma Isabel; GRAJALES, Concepción; GONZÁLEZ-IBARRA, Joaquin; BORJA-ABURTO, Victor Hugo; JAENISCH, Thomas; GONZALEZ-BONILLA, Cesar R. Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with CXCL10 Increase. **Viruses**, vol. 13, no. 1, p. 80, 8 Jan. 2021. DOI 10.3390/v13010080. Available at: https://www.mdpi.com/1999-4915/13/1/80.

CAMINI, Fernanda Caetano; DA SILVA CAETANO, Camila Carla; ALMEIDA, Letícia Trindade; DE BRITO MAGALHÃES, Cintia Lopes. Implications of oxidative stress on viral pathogenesis. **Archives of Virology**, vol. 162, no. 4, p. 907–917, 2017. https://doi.org/10.1007/s00705-016-3187-y.

CAMPOS, Gubio; BANDEIRA, Antonio; SARDI, Silvia. Zika Virus Outbreak, Bahia Brazil. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 21, no. 10, p. 1881, 2015. https://doi.org/10.32301/eid2110.150847.

CAO-LORMEAU, Van-Mai; ROCHE, Claudine; TEISSIER, Anita; ROBIN, Emilie; BERRY, Anne-Laure; MALLET, Henri-Pierre; SALL, Amadou Alpha; MUSSO, Didier. Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerging infectious diseases**, vol. 20, no. 6, p. 1085–1086, Jun. 2014. https://doi.org/10.3201/eid2006.140138.

CAO-LORMEAU, Van Mai; BLAKE, Alexandre; MONS, Sandrine; LASTÈRE, Stéphane; ROCHE, Claudine; VANHOMWEGEN, Jessica; DUB, Timothée; BAUDOUIN, Laure; TEISSIER, Anita; LARRE, Philippe; VIAL, Anne Laure; DECAM, Christophe; CHOUMET, Valérie; HALSTEAD, Susan K.; WILLISON, Hugh J.; MUSSET, Lucile; MANUGUERRA, Jean Claude; DESPRES, Philippe; FOURNIER, Emmanuel; … GHAWCHÉ, Frédéric. Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: A case-control study. **The Lancet**, vol. 387, no. 10027, p. 1531–1539, 9 Apr. 2016. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00562-6.

CAUCHEMEZ, Simon; BESNARD, Marianne; BOMPARD, Priscillia; DUB, Timothée; GUILLEMETTE-ARTUR, Prisca; EYROLLE-GUIGNOT, Dominique; SALJE, Henrik; VAN KERKHOVE, Maria D; ABADIE, Véronique; GAREL, Catherine; FONTANET, Arnaud; MALLET, Henri-Pierre. Association between Zika virus and microcephaly in French Polynesia, 2013–2015: a retrospective study. **Lancet (London, England)**, vol. 387, no. 10033, p. 2125–2132, 21 May 2016. DOI 10.1016/S0140-6736(16)00651-6. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4909533/.

CAVALCANTE, Tamires Barradas; RIBEIRO, Marizélia Rodrigues Costa; SOUSA, Patrícia da Silva; COSTA, Elaine de Paula Fiod; ALVES, Maria Teresa Seabra Soares de Brito e.; SIMÕES, Vanda Maria Ferreira; BATISTA, Rosângela Fernandes Lucena; TAKAHASI, Eliana Harumi Morioka; AMARAL, Gláucio Andrade; KHOURI, Ricardo; BRANCO, Maria dos Remédios Freitas Carvalho; MENDES, Ana Karolina Torres; COSTA, Luciana Cavalcante; CAMPOS, Marcos Adriano Garcia; SILVA, Antônio Augusto Moura da. Congenital Zika syndrome: Growth, clinical, and motor development outcomes up to 36 months of age and differences according to microcephaly at birth. **International Journal of Infectious Diseases**, vol. 105, p. 399–408, 2021. https://doi.org/10.1016/j.ijid.2021.02.072.

CHOI, Gloria B.; YIM, Yeong S.; WONG, Helen; KIM, Sangdoo; KIM, Hyunju; KIM, Sangwon V.; HOEFFER, Charles A.; LITTMAN, Dan R.; HUH, Jun R. The maternal interleukin-17a pathway in mice promotes autism-like phenotypes in offspring. **Science**, vol. 351, no. 6276, p. 933–939, 2016. https://doi.org/10.1126/science.aad0314.

CUGOLA, F R; FERNANDES, I R; RUSSO, F B; FREITAS, B C; DIAS, J L M; GUIMARÃES, K P. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature**, vol. 534, 2016. DOI 10.1038/nature18296. Available at: https://doi.org/10.1038/nature18296.

CULSHAW, Abigail; MONGKOLSAPAYA, Juthathip; SCREATON, Gavin. The immunology of Zika Virus. **F1000Research**, vol. 7, no. 0, p. 203, 2018. https://doi.org/10.12688/f1000research.12271.1.

DANG, Jason; TIWARI, Shashi Kant; LICHINCHI, Gianluigi; QIN, Yue; PATIL, Veena S.; EROSHKIN, Alexey M.; RANA, Tariq M. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, vol. 19, no. 2, p. 258–265, 2016. DOI 10.1016/j.stem.2016.04.014. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.014.

DE NORONHA, Lucia; ZANLUCA, Camila; AZEVEDO, Marina Luize Viola; LUZ, Kleber Giovanni; DOS SANTOS, Claudia Nunes Duarte. Zika virus damages the human placental barrier and presents marked fetal neurotropism. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 111, no. 5, p. 287–293, 2016. https://doi.org/10.1590/0074-02760160085.

DERRAIK, José G; SLANEY, David. Notes on Zika virus – an emerging pathogen now present in the South Pacific. **Australian and New Zealand Journal of Public Health**, vol. 39, no. 1, p. 5–7, 1 Feb. 2015. DOI https://doi.org/10.1111/1753-6405.12302. Available at: https://doi.org/10.1111/1753-6405.12302.

DICK, G W A. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 46, no. 5, p. 521–34, 1 Sep. 1952a. DOI 10.1016/0035-9203(52)90043-6. Available at: https://academic.oup.com/trstmh/article-lookup/doi/10.1016/0035-9203(52)90043-6. Accessed on: 14 Mar. 2021.

DICK, G W A. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, vol. 46, no. 5, p. 521–534, 1 Sep. 1952b. DOI 10.1016/0035-9203(52)90043-6. Available at: https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90043-6.

DICK, G W A; KITCHEN, S F; HADDOW, A J. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, vol. 46, 1952. DOI 10.1016/0035-9203(52)90042-4. Available at: https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4.

DUFFY, Mark R; CHEN, Tai-Ho; HANCOCK, W Thane; POWERS, Ann M; KOOL, Jacob L; LANCIOTTI, Robert S; PRETRICK, Moses; MARFEL, Maria; HOLZBAUER, Stacey; DUBRAY, Christine; GUILLAUMOT, Laurent; GRIGGS, Anne; BEL, Martin; LAMBERT, Amy J; LAVEN, Janeen; KOSOY, Olga; PANELLA, Amanda; BIGGERSTAFF, Brad J; FISCHER, Marc; HAYES, Edward B. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **New England Journal of Medicine**, vol. 360, no. 24, p. 2536–2543, 11 Jun. 2009. DOI 10.1056/NEJMoa0805715. Available at: http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa0805715.

ELBIM, C.; PILLET, S.; PREVOST, M. H.; PREIRA, A.; GIRARD, P. M.; ROGINE, N.; HAKIM, J.; ISRAEL, N.; GOUGEROT-POCIDALO, M. A. The role of phagocytes in HIV-related oxidative stress. **Journal of Clinical Virology**, vol. 20, no. 3, p. 99–109, 2001. https://doi.org/10.1016/S1386-6532(00)00133-5.

ESTES, Myka L.; MCALLISTER, A. Kimberley. Maternal immune activation: Implications for neuropsychiatric disorders. **Science**, vol. 353, no. 6301, p. 772–777, 2016. https://doi.org/10.1126/science.aag3194.

FANTINATO, Francieli Fontana Sutile Tardetti; ARAÚJO, Emerson Luiz Lima; RIBEIRO, Igor Gonçalves; ANDRADE, Marcia Regina de; DANTAS, Anna Livia de Medeiros; RIOS, Jakeline Maria Trinta; SILVA, Odila Márcia Vinhas da; SILVA, Maria do Socorro da; NÓBREGA, Renata Valeria; BATISTA, Daniel de Araújo; LEITE, Priscila Leal e; SAAD, Eduardo; PERCIO, Jadher; RESENDE, Elionardo Andrade; SOUZA, Priscila Bochi de; WADA, Marcelo Yoshito; FANTINATO, Francieli Fontana Sutile Tardetti; ARAÚJO, Emerson Luiz Lima; RIBEIRO, Igor Gonçalves; … WADA, Marcelo Yoshito. Descrição dos primeiros casos de febre pelo vírus Zika investigados em municípios da região Nordeste do Brasil, 2015. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, vol. 25, no. 4, p. 683–690, 2016. DOI 10.5123/S1679-49742016000400002. Available at: http://www.iec.pa.gov.br/template_doi_ess.php?doi=10.5123/S1679-49742016000400683&scielo=S2237-96222016000400683.

FOO, Suan Sin; CHEN, Weiqiang; CHAN, Yen; BOWMAN, James W.; CHANG, Lin Chun; CHOI, Younho; YOO, Ji Seung; GE, Jianning; CHENG, Genhong; BONNIN, Alexandre; NIELSEN-SAINES, Karin; BRASIL, Patrícia; JUNG, Jae U. Asian Zika virus strains target CD14+blood monocytes and

induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. **Nature Microbiology**, vol. 2, no. 11, p. 1558–1570, 2017. https://doi.org/10.1038/s41564-017-0016-3.

FOY, Brian D.; KOBYLINSKI, Kevin C.; FOY, Joy L.Chilson; BLITVICH, Bradley J.; DA ROSA, Amelia Travassos; HADDOW, Andrew D.; LANCIOTTI, Robert S.; TESH, Robert B. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 17, no. 5, p. 880–882, 2011. https://doi.org/10.3201/EID1705.101939.

FRANÇA, Giovanny Vinícius Araújo de; PEDI, Vaneide Daciane; GARCIA, Márcio Henrique de Oliveira; CARMO, Greice Madeleine Ikeda do; LEAL, Mariana Bertol; GARCIA, Leila Posenato. Síndrome congênita associada à infecção pelo vírus Zika em nascidos vivos no Brasil: descrição da distribuição dos casos notificados e confirmados em 2015-2016. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, vol. 27, no. 2, p. 1–12, 2018. DOI 10.5123/S1679-49742018000200014. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S2237-96222018000200315&lng=pt&nrm=iso&tlng=pt.

GARCEZ, Patricia P.; LOIOLA, Erick Correia; COSTA, Rodrigo Madeira; HIGA, Luiza M.; TRINDADE, Pablo; DELVECCHIO, Rodrigo; NASCIMENTO, Juliana Minard; BRINDEIRO, Rodrigo; TANURI, Amilcar; REHEN, Stevens K. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. **Science**, vol. 352, no. 6287, p. 3, 2016. .

GASKELL, Katherine M.; HOULIHAN, Catherine; NASTOULI, Eleni; CHECKLEY, Anna M. Persistent Zika Virus Detection in Semen in a Traveler Returning to the United Kingdom from Brazil, 2016. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 23, no. 1, p. 137–139, Jan. 2017. DOI 10.3201/eid2301.161300. Available at: http://wwwnc.cdc.gov/eid/article/23/1/16-1300_article.htm.

GLASAUER, Andrea; CHANDEL, Navdeep S. ROS. **Current Biology**, vol. 23, no. 3, p. R100–R102, Feb. 2013. DOI 10.1016/j.cub.2012.12.011. Available at: https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0960982212014510.

GORSHKOV, Kirill; SHIRYAEV, Sergey A.; FERTEL, Sophie; LIN, Yi Wen; HUANG, Chun Teng; PINTO, Antonella; FARHY, Chen; STRONGIN, Alex Y.; ZHENG, Wei; TERSKIKH, Alexey V. Zika virus: Origins, pathological action, and treatment strategies. **Frontiers in Microbiology**, vol. 10, no. JAN, p. 1–17, 2019. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.03252.

GOULD, EA; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, vol. 371, no. 9611, p. 500–509, 2008. https://doi.org/10.1016/S0140-6736(08)60238-X.

HAMEL, Rodolphe; DEJARNAC, Ophélie; WICHIT, Sineewanlaya; EKCHARIYAWAT, Peeraya; NEYRET, Aymeric; LUPLERTLOP, Natthanej; PERERA-LECOIN, Manuel; SURASOMBATPATTANA, Pornapat; TALIGNANI, Loïc; THOMAS, Frédéric; CAO-LORMEAU, Van-Mai; CHOUMET, Valérie; BRIANT, Laurence; DESPRÈS, Philippe; AMARA, Ali; YSSEL, Hans; MISSÉ, Dorothée. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, vol. 89, no. 17, p. 8880–8896, 2015. https://doi.org/10.1128/jvi.00354-15.

HAMMON, W M; SCHRACK, W D Jr; SATHER, G E. Serological survey for a arthropod-borne virus infections in the Philippines. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, United States, vol. 7, no. 3, p. 323–328, May 1958. https://doi.org/10.4269/ajtmh.1958.7.323.

HUANG, Huarong; LI, Shihua; ZHANG, Yongli; HAN, Xiaojuan; JIA, Baoqian; LIU, Hongtao; LIU, Dandan; TAN, Shuguang; WANG, Qihui; BI, Yuhai; LIU, William J.; HOU, Baidong; GAO, George Fu; ZHANG, Fuping. CD8 + T Cell Immune Response in Immunocompetent Mice during Zika Virus Infection . **Journal of Virology**, vol. 91, no. 22, p. 1–15, 2017. https://doi.org/10.1128/jvi.00900-17.

IGNARRO, L J. Biosynthesis and metabolism of endothelium-derived nitric oxide. **Annual review of pharmacology and toxicology**, United States, vol. 30, p. 535–560, 1990. https://doi.org/10.1146/annurev.pa.30.040190.002535.

IRELAND, Derek D.C.; MANANGEESWARAN, Mohanraj; LEWKOWICZ, Aaron P.; ENGEL, Kaliroi; CLARK, Sarah M.; LANIYAN, Adelle; SYKES, Jacob; LEE, Ha Na; MCWILLIAMS, Ian L.; KELLEY-BAKER, Logan; TONELLI, Leonardo H; VERTHELYI, Daniela. Long-term persistence of infectious Zika virus: Inflammation and behavioral sequela in mice. **PLoS Pathogens**, vol. 16, no. 12, p. e1008689, 10 Dec. 2020. DOI 10.1371/journal.ppat.1008689. Available at: http://dx.doi.org/10.1371/journal.ppat.1008689.

IVANOV, Alexander V.; BARTOSCH, Birke; SMIRNOVA, Olga A.; ISAGULIANTS, Maria G.; KOCHETKOV, Sergey N. HCV and oxidative stress in the liver. **Viruses**, vol. 5, no. 2, p. 439–469, 2013. https://doi.org/10.3390/v5020439.

JAIN, Amita; PANDEY, Nidhi; GARG, R. K.; KUMAR, Rashmi. IL-17 Level in Patients with Dengue Virus Infection & its Association with Severity of Illness. **Journal of Clinical Immunology**, vol. 33, no. 3, p. 613–618, 29 Apr. 2013. DOI 10.1007/s10875-012-9855-0. Available at: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs10875-012-9855-0.

JAIYEN, Yanin; MASRINOUL, Promsin; KALAYANAROOJ, Siripen; PULMANAUSAHAKUL, Rojjanaporn; UBOL, Sukathida. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. **Microbiology and Immunology**, vol. 53, no. 8, p. 442–450, 1 Aug. 2009a. DOI 10.1111/j.1348-0421.2009.00148.x. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.2009.00148.x. Accessed on: 17 Sep. 2017.

JAIYEN, Yanin; MASRINOUL, Promsin; KALAYANAROOJ, Siripen; PULMANAUSAHAKUL, Rojjanaporn; UBOL, Sukathida. Characteristics of dengue virus-infected peripheral blood mononuclear cell death that correlates with the severity of illness. **Microbiology and Immunology**, vol. 53, no. 8, p. 442–450, 1 Aug. 2009b. DOI 10.1111/j.1348-0421.2009.00148.x. Available at: http://doi.wiley.com/10.1111/j.1348-0421.2009.00148.x. Accessed on: 17 Sep. 2017.

KHAMBADKONE, Seva G; CORDNER, Zachary A; TAMASHIRO, Kellie L K. Maternal stressors and the developmental origins of neuropsychiatric risk. **Frontiers in neuroendocrinology**, vol. 57, ed. 2020/02/18, p. 100834, Apr. 2020. DOI 10.1016/j.yfrne.2020.100834. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32084515.

KOIKE, Haruki. [Zika Virus and Guillain-Barré Syndrome]. **Brain and nerve = Shinkei kenkyu no shinpo**, Japan, vol. 70, no. 2, p. 113–120, Feb. 2018. DOI 10.11477/mf.1416200963. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29433112.

KREBS, Christian F.; REIMERS, Daniel; ZHAO, Yu; PAUST, Hans-Joachim; BARTSCH, Patricia; NUÑEZ, Sarah; ROSEMBLATT, Mariana V.; HELLMIG, Malte; KILIAN, Christoph; BORCHERS, Alina; ENK, Leon U. B.; ZINKE, Michael; BECKER, Martina; SCHMID, Joanna; KLINGE, Stefanie; WONG, Milagros N.; PUELLES, Victor G.; SCHMIDT, Constantin; BERTRAM, Tabea; … MITTRÜCKER, Hans-Willi. Pathogen-induced tissue-resident memory T H 17 (T RM 17) cells amplify autoimmune kidney disease. **Science Immunology**, vol. 5, no. 50, p. eaba4163, 14 Aug. 2020. DOI 10.1126/sciimmunol.aba4163. Available at: https://doi.org/10.1126/sciimmunol.aba4163.

KUNO, Goro; CHANG, Gwong-Jen J; TSUCHIYA, K Richard; KARABATSOS, Nick; CROPP, C Bruce. Phylogeny of the Genus Flavivirus. **Journal of Virology**, vol. 72, no. 1, p. 73–83, 15 Jan. 1998. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC109351/.

KURACHI, Makoto. CD8(+) T cell exhaustion. **Seminars in immunopathology**, Germany, vol. 41,

no. 3, p. 327–337, May 2019. https://doi.org/10.1007/s00281-019-00744-5.

LANCIOTTI, Robert S; KOSOY, Olga L; LAVEN, Janeen J; VELEZ, Jason O; LAMBERT, Amy J; JOHNSON, Alison J; STANFIELD, Stephanie M; DUFFY, Mark R. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. **Emerging Infectious Disease journal**, vol. 14, no. 8, p. 1232, 2008. DOI 10.3201/eid1408.080287. Available at: https://wwwnc.cdc.gov/eid/article/14/8/08-0287_article.

LEVINE, Deborah; JANI, Jacques C.; CASTRO-ARAGON, Ilse; CANNIE, Mieke. How Does Imaging of Congenital Zika Compare with Imaging of Other TORCH Infections? **Radiology**, vol. 285, no. 3, p. 744–761, Dec. 2017. DOI 10.1148/radiol.2017171238. Available at: http://pubs.rsna.org/doi/10.1148/radiol.2017171238.

LI, Cui; XU, Dan; YE, Qing; HONG, Shuai; JIANG, Yisheng; LIU, Xinyi; ZHANG, Nana; SHI, Lei; QIN, Cheng Feng; XU, Zhiheng. Correction: Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice (Cell Stem Cell (2016) 19(5) (672) (S1934590916300844) (10.1016/j.stem.2016.04.017)). **Cell Stem Cell**, vol. 19, no. 5, p. 672, 2016. DOI 10.1016/j.stem.2016.10.017. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.04.017.

LI, Hongda; SAUCEDO-CUEVAS, Laura; REGLA-NAVA, Jose A.; CHAI, Guoliang; SHEETS, Nicholas; TANG, William; TERSKIKH, Alexey V.; SHRESTA, Sujan; GLEESON, Joseph G. Zika Virus Infects Neural Progenitors in the Adult Mouse Brain and Alters Proliferation. **Cell Stem Cell**, vol. 19, no. 5, p. 593–598, Nov. 2016. DOI 10.1016/j.stem.2016.08.005. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1934590916302521. Accessed on: 19 Apr. 2017.

LÓPEZ-GARCÍA, Purificación; MOREIRA, David. Viruses in Biology. **Evolution: Education and Outreach**, vol. 5, no. 3, p. 389–398, 1 Sep. 2012. DOI 10.1007/s12052-012-0441-y. Available at: https://evolution-outreach.biomedcentral.com/articles/10.1007/s12052-012-0441-y.

LUM, Fok Moon; LOW, Donovan K.S.; FAN, Yiping; TAN, Jeslin J.L.; LEE, Bernett; CHAN, Jerry K.Y.; RÉNIA, Laurent; GINHOUX, Florent; NG, Lisa F.P. Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 64, no. 7, p. 914–920, 2017. https://doi.org/10.1093/cid/ciw878.

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**, vol. 48, no. 2, p. 139–145, 1 Mar. 1954. DOI 10.1016/0035-9203(54)90006-1. Available at: https://doi.org/10.1016/0035-9203(54)90006-1.

MANANGEESWARAN, M; IRELAND, D D C; VERTHELYI, D. Zika (PRVABC59) Infection Is Associated with T cell Infiltration and Neurodegeneration in CNS of Immunocompetent Neonatal C57Bl/6 Mice. **PLoS Pathog**, vol. 12, 2016. DOI 10.1371/journal.ppat.1006004. Available at: https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1006004.

MARINO-MERLO, Francesca; PAPAIANNI, Emanuela; FREZZA, Caterina; PEDATELLA, Silvana; DE NISCO, Mauro; MACCHI, Beatrice; GRELLI, Sandro; MASTINO, Antonio. NF-κB-Dependent Production of ROS and Restriction of HSV-1 Infection in U937 Monocytic Cells. **Viruses**, vol. 11, no. 5, 2019. https://doi.org/10.3390/v11050428.

MEERTENS, Laurent; LABEAU, Athena; DEJARNAC, Ophelie; CIPRIANI, Sara; SINIGAGLIA, Laura; BONNET-MADIN, Lucie; LE CHARPENTIER, Tifenn; HAFIRASSOU, Mohamed Lamine; ZAMBORLINI, Alessia; CAO-LORMEAU, Van-Mai; COULPIER, Muriel; MISSÉ, Dorothée; JOUVENET, Nolwenn; TABIBIAZAR, Ray; GRESSENS, Pierre; SCHWARTZ, Olivier; AMARA, Ali. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. **Cell Reports**, vol. 18, no. 2, p. 324–333, Jan. 2017. DOI 10.1016/j.celrep.2016.12.045. Available at:

http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S2211124716317521. Accessed on: 18 Aug. 2017.

MELO, Adriana Suely de Oliveira; AGUIAR, Renato Santana; AMORIM, Melania Maria Ramos; ARRUDA, Monica B; MELO, Fabiana de Oliveira; RIBEIRO, Suelem Taís Clementino; BATISTA, Alba Gean Medeiros; FERREIRA, Thales; DOS SANTOS, Mayra Pereira; SAMPAIO, Virgínia Vilar; MOURA, Sarah Rogéria Martins; RABELLO, Luciana Portela; GONZAGA, Clarissa Emanuelle; MALINGER, Gustavo; XIMENES, Renato; DE OLIVEIRA-SZEJNFELD, Patricia Soares; TOVAR-MOLL, Fernanda; CHIMELLI, Leila; SILVEIRA, Paola Paz; … TANURI, Amilcar. Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. **JAMA Neurology**, vol. 73, no. 12, p. 1407–1416, 1 Dec. 2016. DOI 10.1001/jamaneurol.2016.3720. Available at: https://doi.org/10.1001/jamaneurol.2016.3720.

MICHLMAYR, Daniela; ANDRADE, Paulina; GONZALEZ, Karla; BALMASEDA, Angel; HARRIS, Eva. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. **Nature Microbiology**, vol. 2, no. 11, p. 1462–1470, 2 Nov. 2017. DOI 10.1038/s41564-017-0035-0. Available at: https://doi.org/10.1038/s41564-017-0035-0.

MIHARA, Masahiko; HASHIZUME, Misato; YOSHIDA, Hiroto; SUZUKI, Miho; SHIINA, Masashi. IL-6/IL-6 receptor system and its role in physiological and pathological conditions. **Clinical Science**, vol. 122, no. 4, p. 143–159, 14 Oct. 2011. DOI 10.1042/CS20110340. Available at: https://doi.org/10.1042/CS20110340.

MILLER, Eliza; BECKER, Zoe; SHALEV, Daniel; LEE, Christopher T.; CIOROIU, Comana; THAKUR, Kiran. Probable Zika virus-associated Guillain-Barré syndrome: Challenges with clinico-laboratory diagnosis. **Journal of the Neurological Sciences**, vol. 375, p. 367–370, Apr. 2017. DOI 10.1016/j.jns.2017.02.029. Available at: http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0022510X17301260. Accessed on: 17 Apr. 2017.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Integrated monitoring of growth and developmental alterations in relation to Zika virus and other infectious ethiologies up to 52 epidemiological week of 2017. **Boletim Epidemiológico**, vol. 49, no. 6, p. 1–10, 2018. Available at: http://portalms.saude.gov.br/boletins-epidemiologicos.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Síndrome congênita associada à infeccção pelo vírus Zika. **Boletim Epidemiológico**, , p. 1–30, 2019. .

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Óbito por arboviroses no Brasil, 2008 a 2019. **Boletim Epidemiológico**, vol. 51, p. 31, 2020. Available at: https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/August/21/Boletim-epidemiologico-SVS-33.pdf.

MISHRA, B; BEHERA, B. The mysterious Zika virus: Adding to the tropical flavivirus mayhem. **Journal of Postgraduate Medicine**, vol. 62, no. 4, p. 249, 2016. DOI 10.4103/0022-3859.191006. Available at: https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27763483.

MLAKAR, Jernej; KORVA, Misa; TUL, Natasa; POPOVIC, Mara; POLJSAK-PRIJATELJ, Mateja; MRAZ, Jerica; KOLENC, Marko; RUS, Katarina Resman; VIPOTNIK, Tina Vesnaver; VODUSEK, Vesna Fabjan; VIZJAK, Alenka; PIZEM, Joze; PETROVEC, Miroslav; ZUPANC, Tatjana Avsic. Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England Journal of Medicine**, vol. 10, 2016. https://doi.org/10.1056/NEJMoa1600651.

MOORE, CA.; STAPLES, J; WB, Dobyns; AL, Et. Characterizing the pattern of anomalies in congenital zika syndrome for pediatric clinicians. **JAMA Pediatrics**, vol. 171, no. 3, p. 288–295, 1 Mar. 2017. Available at: http://dx.doi.org/10.1001/jamapediatrics.2016.3982.

MUSSO, D; NHAN, T; ROBIN, E; ROCHE, C; BIERLAIRE, D; ZISOU, K; SHAN YAN, A; CAO-LORMEAU, V; BROULT, J. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. **Eurosurveillance**, Sweden, vol. 19, no. 14, p. 20761, 10 Apr. 2014. DOI 10.2807/1560-7917.ES2014.19.14.20761. Available at: https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24739982.

NARASIMHAN, Harish; CHUDNOVETS, Anna; BURD, Irina; PEKOSZ, Andrew; KLEIN, Sabra L. Animal models of congenital zika syndrome provide mechanistic insight into viral pathogenesis during pregnancy. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 14, no. 10, p. 1–20, 2020. DOI 10.1371/journal.pntd.0008707. Available at: http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0008707.

NAUMENKO, Victor; TURK, Madison; JENNE, Craig N.; KIM, Seok-Joo. Neutrophils in viral infection. **Cell and Tissue Research**, vol. 371, no. 3, p. 505–516, 11 Mar. 2018. DOI 10.1007/s00441-017-2763-0. Available at: https://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00441-017-2763-0.

NIELSEN-SAINES, Karin; BRASIL, Patrícia; KERIN, Tara; VASCONCELOS, Zilton; GABAGLIA, Claudia Raja; DAMASCENO, Luana; PONE, Marcos; ABREU DE CARVALHO, Liege M; PONE, Sheila M; ZIN, Andrea A; TSUI, Irena; SALLES, Tania Regina S; DA CUNHA, Denise Cotrim; COSTA, Roozemerie Pereira; MALACARNE, Jociele; REIS, Ana Beatriz; HASUE, Renata Hydee; AIZAWA, Carolina Y P; GENOVESI, Fernanda F; … MOREIRA, Maria Elisabeth. Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. **Nature Medicine**, vol. 25, no. 8, p. 1213–1217, 2019. DOI 10.1038/s41591-019-0496-1. Available at: https://doi.org/10.1038/s41591-019-0496-1.

NIKITINA, Ekaterina; LARIONOVA, Irina; CHOINZONOV, Evgeniy; KZHYSHKOWSKA, Julia. Monocytes and Macrophages as Viral Targets and Reservoirs. **International Journal of Molecular Sciences**, vol. 19, no. 9, p. 2821, 18 Sep. 2018. DOI 10.3390/ijms19092821. Available at: http://www.mdpi.com/1422-0067/19/9/2821.

OEHLER, E; WATRIN, L; LARRE, P; LEPARC-GOFFART, I; LASTERE, S; VALOUR, F; BAUDOUIN, L; MALLET, Hp; MUSSO, D; GHAWCHE, F. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, vol. 19, no. 9, p. 7–9, 2014. DOI 10.2807/1560-7917.ES2014.19.9.20720. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24626205.

OLAGNIER, David; AMATORE, Donatella; CASTIELLO, Luciano; FERRARI, Matteo; PALERMO, Enrico; DIAMOND, Michael S.; PALAMARA, Anna Teresa; HISCOTT, John. Dengue Virus Immunopathogenesis: Lessons Applicable to the Emergence of Zika Virus. **Journal of Molecular Biology**, vol. 428, no. 17, p. 3429–3448, 2016. https://doi.org/10.1016/j.jmb.2016.04.024.

OLAGNIER, David; PERI, Suraj; STEEL, Courtney; VAN MONTFOORT, Nadine; CHIANG, Cindy; BELJANSKI, Vladimir; SLIFKER, Michael; HE, Zhong; NICHOLS, Carmen N; LIN, Rongtuan; BALACHANDRAN, Siddharth; HISCOTT, John. Cellular Oxidative Stress Response Controls the Antiviral and Apoptotic Programs in Dengue Virus-Infected Dendritic Cells. **PLoS Pathogens**, San Francisco, USA, vol. 10, no. 12, p. e1004566, 18 Dec. 2014. DOI 10.1371/journal.ppat.1004566. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4270780/.

ORNELAS, Alice M.M.; PEZZUTO, Paula; SILVEIRA, Paola P; MELO, Fabiana O.; FERREIRA, Thales A; OLIVEIRA-SZEJNFELD, Patricia S; LEAL, Jeime I; AMORIM, Melania M.R.; HAMILTON, Stuart; RAWLINSON, William D; CARDOSO, Cynthia C; NIXON, Douglas F; TANURI, Amilcar; MELO, Adriana S; AGUIAR, Renato S. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. **Annals of Neurology**, vol. 81, no. 1, p. 152–156, 1 Jan. 2017. DOI 10.1002/ana.24839. Available at: https://doi.org/10.1002/ana.24839.

ORZALLI, Megan H; KAGAN, Jonathan C; CHILDREN, Boston; AVENUE, Longwood. Apoptosis and necroptosis as host defense strategies to prevent viral infection. **Trends Cell Biol.**, vol. 27, no. 11, p. 800–809, 2018. https://doi.org/10.1016/j.tcb.2017.05.007.Apoptosis.

OWCZAREK, Katarzyna; CHYKUNOVA, Yuliya; JASSOY, Christian; MAKSYM, Beata; RAJFUR, Zenon; PYRC, Krzysztof. Zika virus: Mapping and reprogramming the entry. **Cell Communication and Signaling**, vol. 17, no. 1, p. 1–19, 2019. https://doi.org/10.1186/s12964-019-0349-z.

PARDY, Ryan D.; RICHER, Martin J. Protective to a T: The Role of T Cells during Zika Virus Infection. **Cells**, vol. 8, no. 8, p. 1–11, 2019. https://doi.org/10.3390/cells8080820.

PETERSEN, Lyle R; JAMIESON, Denise J; POWERS, Ann M; HONEIN, Margaret A. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, vol. 374, no. 16, p. 1552–1563, 21 Apr. 2016. DOI 10.1056/NEJMra1602113. Available at: https://doi.org/10.1056/NEJMra1602113.

PUTTABYATAPPA, Muraly; BANKER, Margaret; ZENG, Lixia; GOODRICH, Jaclyn M; DOMINO, Steven E; DOLINOY, Dana C; MEEKER, John D; PENNATHUR, Subramaniam; SONG, Peter X.K.; PADMANABHAN, Vasantha. Maternal Exposure to Environmental Disruptors and Sexually Dimorphic Changes in Maternal and Neonatal Oxidative Stress. **Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism**, vol. 105, no. 2, p. 492–505, 2020. DOI 10.1210/clinem/dgz063. Available at: https://academic.oup.com/jcem492.

QIAN, Xuyu; NGUYEN, Ha Nam; SONG, Mingxi M.; HADIONO, Christopher; OGDEN, Sarah C.; HAMMACK, Christy; YAO, Bing; HAMERSKY, Gregory R.; JACOB, Fadi; ZHONG, Chun; YOON, Ki-jun; JEANG, William; LIN, Li; LI, Yujing; THAKOR, Jai; BERG, Daniel A.; ZHANG, Ce; KANG, Eunchai; CHICKERING, Michael; … MING, Guo-li. Brain-Region-Specific Organoids Using Mini-bioreactors for Modeling ZIKV Exposure. **Cell**, vol. 165, no. 5, p. 1238–1254, May 2016. DOI 10.1016/j.cell.2016.04.032. Available at: http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0092867416304676. Accessed on: 12 Apr. 2017.

REGLA-NAVA, Jose Angel; NGONO, Annie Elong; VIRAMONTES, Karla M; HUYNH, Anh-Thy; WANG, Ying-Ting; NGUYEN, Anh-Viet T; SALGADO, Rebecca; MAMIDI, Anila; KIM, Kenneth; DIAMOND, Michael S; SHRESTA, Sujan. Cross-reactive Dengue virus-specific CD8 + T cells protect against Zika virus during pregnancy. [*s. d.*]. DOI 10.1038/s41467-018-05458-0. Available at: www.nature.com/naturecommunications.

REYES, Leticia; GOLOS, Thaddeus G. Hofbauer Cells: Their Role in Healthy and Complicated Pregnancy. **Frontiers in Immunology**, vol. 9, no. November, p. 1–8, 15 Nov. 2018. DOI 10.3389/fimmu.2018.02628. Available at: https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fimmu.2018.02628/full.

REYNOLDS, Catherine J; WATBER, Patricia; SANTOS, Camilla Natália Oliveira; RIBEIRO, Danielle Rodrigues; ALVES, Juliana Cardoso; FONSECA, Adriana B L; BISPO, Ana J B; PORTO, Roseane L S; BOKEA, Kalliopi; DE JESUS, Amélia Maria Ribeiro; DE ALMEIDA, Roque Pacheco; BOYTON, Rosemary J; ALTMANN, Daniel M. 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**, vol. 11, p. 185, 2020. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00185.

RIBEIRO, Lucas Secchim; MARQUES, Rafael Elias; JESUS, Am??lia Maria Ribeiro De; ALMEIDA, Roque Pacheco De; TEIXEIRA, Mauro Martins. Zika crisis in Brazil: Challenges in research and development. **Current Opinion in Virology**, vol. 18, p. 76–81, 2016. https://doi.org/10.1016/j.coviro.2016.04.002.

RIBEIRO, Marizélia R. C.; KHOURI, Ricardo; SOUSA, Patrícia S.; BRANCO, Maria R. F. C.; BATISTA, Rosângela F. L.; COSTA, Elaine P. F.; ALVES, Maria T. S. S. B.; AMARAL, Gláucio A.; BORGES, Marcella C. R.; TAKAHASI, Eliana H. M.; GOMES, Líllian N.; MENDES, Ana K. T.; CAVALCANTE,

Tamires B.; COSTA, Luciana C.; FÉLIX, Alvina C.; SOUZA, Nathalia C. S.; SILVA, Antônio A. M. Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in the Congenital Zika Syndrome: Positivity and Associations with Laboratory, Clinical, and Imaging Characteristics. **Viruses**, vol. 12, no. 11, p. 1244, 31 Oct. 2020. DOI 10.3390/v12111244. Available at: https://www.mdpi.com/1999-4915/12/11/1244.

RICE, Marion E.; GALANG, Romeo R.; ROTH, Nicole M.; ELLINGTON, Sascha R.; MOORE, Cynthia A.; VALENCIA-PRADO, Miguel; ELLIS, Esther M.; TUFA, Aifili John; TAULUNG, Livinson A.; ALFRED, Julia M.; PÉREZ-PADILLA, Janice; DELGADO-LÓPEZ, Camille A.; ZAKI, Sherif R.; REAGAN-STEINER, Sarah; BHATNAGAR, Julu; NAHABEDIAN, John F.; REYNOLDS, Megan R.; YEARGIN-ALLSOPP, Marshalyn; VIENS, Laura J.; … HONEIN, Margaret A. Vital Signs: Zika-Associated Birth Defects and Neurodevelopmental Abnormalities Possibly Associated with Congenital Zika Virus Infection — U.S. Territories and Freely Associated States, 2018. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, vol. 67, no. 31, p. 858–868, 2018. https://doi.org/10.15585/mmwr.mm6731e1.

ROSE, Destanie R.; CAREAGA, Milo; VAN DE WATER, Judy; MCALLISTER, Kim; BAUMAN, Melissa D.; ASHWOOD, Paul. Long-term altered immune responses following fetal priming in a non-human primate model of maternal immune activation. **Brain, Behavior, and Immunity**, vol. 63, p. 60–70, 1 Jul. 2017. https://doi.org/10.1016/j.bbi.2016.11.020.

SANTOS, Claudia Nunes Duarte dos; GOLDENBERG, Samuel. Zika Virus and Microcephaly: Challenges for a Long-Term Agenda. **Trends in Parasitology**, vol. 32, no. 7, p. 508–511, 2016. DOI 10.1016/j.pt.2016.03.008. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.pt.2016.03.008.

SARNO, Manoel; SACRAMENTO, Gielson A.; KHOURI, Ricardo; DO ROSÁRIO, Mateus S.; COSTA, Federico; ARCHANJO, Gracinda; SANTOS, Luciane A.; NERY, Nivison; VASILAKIS, Nikos; KO, Albert I.; DE ALMEIDA, Antonio R.P. Zika Virus Infection and Stillbirths: A Case of Hydrops Fetalis, Hydranencephaly and Fetal Demise. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 10, no. 2, p. e0004517, 25 Feb. 2016. DOI 10.1371/journal.pntd.0004517. Available at: http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0004517. Accessed on: 8 Mar. 2017.

SHIMIZU, Yo; TSUKADA, Tsuyoshi; SAKATA-HAGA, Hiromi; SAKAI, Daisuke; SHOJI, Hiroki; SAIKAWA, Yutaka; HATTA, Toshihisa. Exposure to maternal immune activation causes congenital unfolded protein response defects and increases the susceptibility to postnatal inflammatory stimulation in offspring. **Journal of Inflammation Research**, vol. 14, p. 355–365, Feb. 2021. DOI 10.2147/JIR.S294238. Available at: http://doi.org/10.2147/JIR.S294238.

SILVA, Antônio Augusto.; BARBIERI, Marco A.; ALVES, Maria T.; CARVALHO, Carolina A.; BATISTA, Rosângela F.; RIBEIRO, Marizélia R.; LAMY-FILHO, Fernando; LAMY, Zeni C.; CARDOSO, Viviane C.; CAVALLI, Ricardo C.; SIMÕES, Vanda M.; BETTIOL, Heloisa. Prevalence and Risk Factors for Microcephaly at Birth in Brazil in 2010. **Pediatrics**, vol. 141, no. 2, p. e20170589, 1 Feb. 2018. DOI 10.1542/peds.2017-0589. Available at: http://pediatrics.aappublications.org/lookup/doi/10.1542/peds.2017-0589.

SILVA, Antonio Augusto Moura; GANZ, Jucelia Sousa Santos; SOUSA, Patricia da Silva; DORIQUI, Maria Juliana Rodvalho; RIBEIRO, Marizelia Rodrigues Costa; BRANCO, Maria dos Remédios Freitas Carvalho; QUEIROZ, Rejane Christine de Sousa; PACHECO, Maria de Jesus Torres; VIEIRA DA COSTA, Flavia Regina; SILVA, Francelena de Sousa; SIMÕES, Vanda Maria Ferreira; PACHECO, Marcos Antonio Barbosa; LAMY-FILHO, Fernando; LAMY, Zeni Carvalho; SOARES DE BRITTO E ALVES, Maria Teresa Seabra. Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. **Emerging Infectious Diseases**, vol. 22, no. 11, p. 1953–1956, Nov. 2016. DOI 10.3201/eid2211.160956. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5088045/.

SMITH, Stephen E P; LI, Jennifer; GARBETT, Krassimira; MIRNICS, Karoly; PATTERSON, Paul H.

Maternal Immune Activation Alters Fetal Brain Development through Interleukin-6. **Journal of Neuroscience**, vol. 27, no. 40, p. 10695–10702, 3 Oct. 2007. DOI 10.1523/JNEUROSCI.2178-07.2007. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17913903.

SMITHBURN, K C. Neutralizing antibodies against arthropod-borne viruses in the sera of long-time residents of Malaya and Borneo. **American journal of hygiene**, United States, vol. 59, no. 2, p. 157–163, Mar. 1954. https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.aje.a119630.

SMITHBURN, K C. Neutralizing antibodies against certain recently isolated viruses in the sera of human beings residing in East Africa. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, United States, vol. 69, no. 2, p. 223–234, Aug. 1952. .

TANG, H; HAMMACK, C; OGDEN, S C; WEN, Z; QIAN, X; LI, Y. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, vol. 18, 2016. DOI 10.1016/j.stem.2016.02.016. Available at: https://doi.org/10.1016/j.stem.2016.02.016.

TEIXEIRA, Franciane Mouradian Emidio; PIETROBON, Anna Julia; OLIVEIRA, Luana de Mendonça; OLIVEIRA, Luanda Mara da Silva; SATO, Maria Notomi. Maternal-Fetal Interplay in Zika Virus Infection and Adverse Perinatal Outcomes. **Frontiers in Immunology**, vol. 11, no. February, p. 1–15, 2020. https://doi.org/10.3389/fimmu.2020.00175.

THAM, Hong Wai; BALASUBRAMANIAM, Vinod; OOI, Man K.; CHEW, Miaw Fang. Viral determinants and vector competence of Zika Virus transmission. **Frontiers in Microbiology**, vol. 9, no. MAY, p. 1–11, 2018. https://doi.org/10.3389/fmicb.2018.01040.

TSAI, Yi Ting; CHANG, Sui Yuan; LEE, Chun Nan; KAO, Chuan Liang. Human TLR3 recognizes dengue virus and modulates viral replication in vitro. **Cellular Microbiology**, 2009. https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2008.01277.x.

VALERO, Nereida; MOSQUERA, Jesús; AÑEZ, Germán; LEVY, Alegria; MARCUCCI, Rafael; DE MON, Melchor Alvarez. Differential Oxidative Stress Induced by Dengue Virus in Monocytes from Human Neonates, Adult and Elderly Individuals. **PLoS ONE**, vol. 8, no. 9, 2013. https://doi.org/10.1371/journal.pone.0073221.

VAN DER LINDEN, Vanessa; PESSOA, André; DOBYNS, William; BARKOVICH, A. James; JÚNIOR, Hélio van der Linden; FILHO, Epitacio Leite Rolim; RIBEIRO, Erlane Marques; LEAL, Mariana de Carvalho; COIMBRA, Pablo Picasso de Araújo; ARAGÃO, Maria de Fátima Viana Vasco; VERÇOSA, Islane; VENTURA, Camila; RAMOS, Regina Coeli; CRUZ, Danielle Di Cavalcanti Sousa; CORDEIRO, Marli Tenório; MOTA, Vivian Maria Ribeiro; DOTT, Mary; HILLARD, Christina; MOORE, Cynthia A. Description of 13 Infants Born During October 2015–January 2016 With Congenital Zika Virus Infection Without Microcephaly at Birth — Brazil. **MMWR. Morbidity and Mortality Weekly Report**, vol. 65, no. 47, p. 1343–1348, 2 Dec. 2016. DOI 10.15585/mmwr.mm6547e2. Available at: http://www.cdc.gov/mmwr/volumes/65/wr/mm6547e2.htm.

VESELY, Maria Carolina Amezcua; PALLIS, Paris; BIELECKI, Piotr; LOW, Jun Siong; ZHAO, Jun; HARMAN, Christian C D; KROEHLING, Lina; JACKSON, Ruaidhrí; BAILIS, Will; LICONA-LIMÓN, Paula; XU, Hao; IIJIMA, Norifumi; PILLAI, Padmini S; KAPLAN, Daniel H; WEAVER, Casey T; KLUGER, Yuval; KOWALCZYK, Monika S; IWASAKI, Akiko; PEREIRA, Joao P; … FLAVELL, Richard A. Effector TH17 Cells Give Rise to Long-Lived TRM Cells that Are Essential for an Immediate Response against Bacterial Infection. **Cell**, vol. 178, no. 5, p. 1176-1188.e15, 22 Aug. 2019. DOI 10.1016/j.cell.2019.07.032. Available at: https://doi.org/10.1016/j.cell.2019.07.032.

VISSOCI, João Ricardo Nickenig; ROCHA, Thiago Augusto Hernandes; SILVA, Núbia Cristina da; DE SOUSA QUEIROZ, Rejane Christine; THOMAZ, Erika Bárbara Abreu Fonseca; AMARAL, Pedro Vasconcelos Maia; LEIN, Adriana; BRANCO, Maria dos Remédios Freitas Carvalho; AQUINO, José; RODRIGUES, Zulimar Márita Ribeiro; DA SILVA, Antônio Augusto Moura; STATON, Catherine.

Zika virus infection and microcephaly: Evidence regarding geospatial associations. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, vol. 12, no. 4, p. 1–16, 2018. https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0006392.

WAGGONER, Jesse J.; PINSKY, Benjamin A. Zika virus: Diagnostics for an emerging pandemic threat. **Journal of Clinical Microbiology**, vol. 54, no. 4, p. 860–867, 2016. https://doi.org/10.1128/JCM.00279-16.

WEAVER, Scott C.; COSTA, Federico; GARCIA-BLANCO, Mariano A.; KO, Albert I.; RIBEIRO, Guilherme S.; SAADE, George; SHI, Pei Yong; VASILAKIS, Nikos. Zika virus: History, emergence, biology, and prospects for control. **Antiviral Research**, vol. 130, p. 69–80, 2016. DOI 10.1016/j.antiviral.2016.03.010. Available at: http://dx.doi.org/10.1016/j.antiviral.2016.03.010.

WIJDICKS, Eelco F.M.; KLEIN, Christopher J. Guillain-Barré Syndrome. **Mayo Clinic Proceedings**, England, vol. 92, no. 3, p. 467–479, Mar. 2017. DOI 10.1016/j.mayocp.2016.12.002. Available at: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28259232.

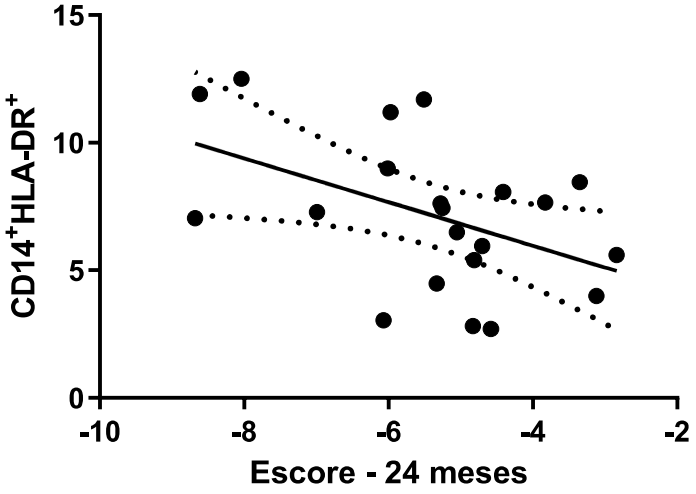
YOCKEY, Laura J; IWASAKI, Akiko. Role of interferons and cytokines in pregnancy and fetal development. **Immunity**, vol. 49, no. 3, p. 397–412, 2018. https://doi.org/10.1016/j.immuni.2018.07.017.Role.

ZANLUCA, Camila; DE MELO, Vanessa Campos Andrade; MOSIMANN, Ana Luiza Pamplona; DOS SANTOS, Glauco Igor Viana; DOS SANTOS, Claudia Nunes Duarte; LUZ, Kleber. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 110, no. 4, p. 569–572, Jun. 2015. DOI 10.1590/0074-02760150192. Available at: http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0074-02762015000400569&lng=en&nrm=iso&tlng=en. Accessed on: 17 Mar. 2017.

ZHAO, Yu; KILIAN, Christoph; TURNER, Jan-Eric; BOSURGI, Lidia; ROEDL, Kevin; BARTSCH, Patricia; GNIRCK, Ann-Christin; CORTESI, Filippo; SCHULTHEISS, Christoph; HELLMIG, Malte; ENK, Leon U B; HAUSMANN, Fabian; BORCHERS, Alina; WONG, Milagros N; PAUST, Hans-Joachim; SIRACUSA, Francesco; SCHEIBEL, Nicola; HERRMANN, Marissa; ROSATI, Elisa; … KREBS, Christian F. Clonal expansion and activation of tissue-resident memory-like Th17 cells expressing GM-CSF in the lungs of severe COVID-19 patients. **Science immunology**, vol. 6, no. 56, Feb. 2021. https://doi.org/10.1126/sciimmunol.abf6692.

APÊNDICE

Apêndice 1



Correlação entre as populações de monócitos $CD14^{+}HLA^{+}$ das crianças PRNT+ com o escore Z do perímetro cefálico cm 24 meses. As correlações foram verificadas utilizando o teste de Pearson, $p < 0,05$.

Apêndice 2

APÊNDICE V

UNIVERSIDADE FEDERAL DO MARANHÃO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

NOME DA PESQUISA:

"Monitoramento da microcefalia em recém-nascidos e acompanhamento clínico e de crescimento e desenvolvimento de uma coorte de crianças com infecção congênita pelo vírus da ZIKA".

"*Síndrome congênita pelo Zika vírus, soroprevalência e análise espacial e temporal de vírus Zika e Chikungunya no Maranhão*".

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. Dr. Antônio Augusto Moura da Silva

TELEFONES PARA CONTATO: (98) 327-29681/3272-9675.

PATROCINADOR FINANCEIRO DA PESQUISA: CNPq/FAPEMA

OBJETIVOS DA PESQUISA:

Somos um grupo de pesquisadores da Universidade Federal do Maranhão (UFMA) e estamos realizando uma pesquisa para entender se os recentes casos de bebês maranhenses com cabeças menores que o normal para idade (o que chamamos de microcefalia) estão relacionados ao fato de suas mães terem tido infecção pelo vírus Zika quando estavam grávidas. Para isso, precisamos comparar alguns dados do prontuário de bebês nascidos com microcefalia e de bebês nascidos com o tamanho da cabeça normal. Esses dados são coletados rotineiramente por ocasião do nascimento e das avaliações clínicas realizadas no acompanhamento durante a internação. Convidamos você a participar desta pesquisa e pedimos que autorize a participação do seu bebê.

Este é um formulário de consentimento, que fornece informações sobre a pesquisa. Se concordar em participar, você precisará assinar este formulário.

Antes de conhecer a pesquisa, é importante saber o seguinte:

- Sua participação é voluntária. Não é obrigatório você participar da pesquisa.
- Você pode decidir não participar ou desistir de participar da pesquisa a qualquer momento.
- Ressaltamos que, sua participação é muito importante para que as informações obtidas possam contribuir para o conhecimento mais completo dessa doença que tantos agravos tem trazido aos bebês.
- Afirmamos ainda que esta pesquisa está sendo iniciada após aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão. Comitês de Ética são colegiados interdisciplinares e independentes, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criados para garantir a proteção dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos.
- Este termo de consentimento livre e esclarecido será rubricado em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, por você, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou membro da equipe.
- Este termo de consentimento livre e esclarecido foi elaborado em duas vias, sendo que uma ficará com o pesquisador responsável e outra com você.

O QUE DEVO FAZER PARA PARTICIPAR DESTA PESQUISA?

Se você concordar em participar desta pesquisa, você nos autorizará a coletar material biológico (sangue) seu e de seu filho, para confirmação diagnóstica do vírus Zika e avaliação da resposta imune ao vírus, além coletar dados do seu prontuário e de seu filho, por ocasião do nascimento e do acompanhamento de rotina realizado pelos profissionais que o acompanham, incluindo alguns exames de imagem, caso tenham sido realizados, avaliação de desenvolvimento, exame oftalmológico, odontológico, para nos ajudar a compreender os motivos do nascimento de bebês com microcefalia e suas consequências.

QUAIS SÃO OS RISCOS DA PESQUISA?

Os profissionais que realizarão as entrevistas e os exames são treinados para as tarefas. Reiteramos que o estudo não apresenta nenhum risco físico, posto que os exames clínicos

realizados serão feitos por profissionais qualificados e fazem parte da rotina de acompanhamento de crianças. A coleta de sangue pode causar algum desconforto, mas tomaremos todos os cuidados para que isso não ocorra. Entretanto, se você, em qualquer momento da pesquisa, se sentir desconfortável em participar, poderá interromper a participação, se assim desejar.

HÁ BENEFÍCIOS EM PARTICIPAR DESTA PESQUISA?

A sua participação e de seu bebê ajudarão a entender o recente fenômeno de muitos casos de microcefalia em recém-nascidos, filhos de mães infectadas pelo vírus Zika. Conhecer os fatores que podem favorecer o nascimento de um bebê com microcefalia poderá ajudar você e outras famílias, em futuras gestações, ou outras pessoas que possam vir a ter risco de microcefalia pelo vírus Zika. Quando este estudo acabar, os resultados serão discutidos com outros pesquisadores e divulgados para que muitas pessoas se beneficiem desse conhecimento, mas sem identificar sua participação no estudo. Além disso, ainda poderá contribuir com novas estratégias para o combate às consequências do grave problema.

E A CONFIDENCIALIDADE?

Os registros referentes aos seus dados e de seu filho permanecerão confidenciais. Vocês serão identificados por um código, e as informações pessoais contidas nos registros não serão divulgadas sem sua expressa autorização. Além disso, no caso de publicação deste estudo, não serão utilizados seus nomes ou qualquer dado que os identifiquem.

O QUE FAÇO EM CASO DE DÚVIDAS OU PROBLEMAS?

Para solucionar dúvidas relativas a este estudo, entre em contato com os Profs. Drs: Antonio Augusto Moura da Silva (98) 3272-9681, das 8:00 às 18 horas.

Para obter informações sobre seus direitos como objeto de pesquisa, entre em contato com: Presidente do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário da Universidade Federal do Maranhão pelo telefone (98) 2109- 1250.

Endereço do CEP-HUUFMA: Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Universitário. Telefone (98)

2109 1250, endereço Rua Barão de Itapary, 227, quarto andar, Centro, São Luís-MA. CEP- 65.020-070.

Se você entendeu a explicação e concorda voluntariamente em participar deste estudo, por favor, assine abaixo. Uma cópia ficará com você e a outra com o pesquisador responsável. A participação é voluntária e você pode deixar a pesquisa em qualquer momento, sem ter que dar qualquer justificativa ou ser penalizado.

Agradecemos muito a sua colaboração.

ASSINATURAS:

Nome do voluntário:

_____

Assinatura do voluntário:

_____

Data: ____/_____/_____

Nome do Pesquisador:

_____

Assinatura do Pesquisador:

_____

Data: ____/_____/_____

Apêndice 3 – Artigos produzidos a partir da tese (1)

Artigo será submetido para revista *Journal Clinical Immunology* (Fator de impacto 8.3).

Maternal Immune Response to ZIKV Triggers High Inflammatory Profile in Congenital Zika Syndrome

Eder M.S. Fialho MSc[1], Emanoel M. Veras[2], Caroline M. de Jesus[3], Líllian N. Gomes MSc[4], Ricardo Kouri PhD[5], Patrícia S. Sousa MD PhD[6], Marizelia R.C. Ribeiro MD PhD[7], Antônio A.M. Silva MD PhD[8]; [1,8]Flávia R.F. Nascimento PhD[1,9]; Paulo V.S. Pereira PhD[1,9*].

[1] Health Sciences Postgraduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[2] Medical School, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

[3] Pharmacy Program, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[4] Department of Immunology, University of São Paulo, SP, Brazil.

[5] Gonçalo Moniz Research Institute – FIOCRUZ – Salvador, BA, Brazil.

[6] Department of Medicine I, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[7] Department of Medicine III, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[8] Department of Public Health, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[9] Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

Keywords:

Interleukin-17, Microcephaly, Zika virus infection.

Running title: Inflammatory Profile in CZS.

Corresponding author:

Eder Magalhães Silva Fialho Msc

1966 Portugueses Av., Biological and Health Sciences Center

Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão

São Luís, MA 65085-580, Brazil

Telephone number: +55 (98) 98126-8782

Fax number: +55 (98) 3272-8701

E-mail address: eder.fialho@discente.ufma.br

Alternate corresponding author:

Paulo Vítor Soeiro Pereira PhD

1966 Portugueses Av., Biological and Health Sciences Center

Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão

São Luís, MA 65085-580, Brazil

Telephone number: +55 (98) 98346-9996

Fax number: +55 (98) 3272-8701

E-mail address: paulo.soeiro@ufma.br

Short summary:

Our results show that the maternal pro-inflammatory immune response with a increased serum IL-17, acts as a trigger for the development and progression of the CZS.

Abstract

Background: Brazil was one of the countries that experienced an outbreak of congenital disabilities due to maternal Zika infection, Congenital Zika Syndrome (CZS). Zika is an arbovirus that causes a diversity of symptoms in young and adult patients and can induce severe manifestations in the embryo during gestation, such as malformations of the central nervous system. Since the Zika virus can modulate the immune system, study mothers and children's immune profiles become essential to better understanding the CZS development. We propose to investigate the lymphocytes population profile of children who developed CZS and their mother's immune response.

Methods: Exposure to ZIKV was confirmed through the Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) (CZS+ group). To evaluate the general immune profile, we performed blood lymphocytes immunophenotyping and serum cytokine dosage.

Results: The immunophenotyping and cytokine production profile was correlated between CSZ+ children and their mothers. Both exhibited increased serum interleukin-17 and a reduction in the subpopulation of CD4+ T lymphocytes. The mothers show a reduction in the population of B lymphocytes.

Conclusion: The development of CZS is related to the modulation of children's immune response by the mothers' immune-inflammatory profile, characterized by Th17 activation.

Artigos produzidos a partir da tese (2)

O artigo será submetido para revista *Free radical Biology and Medicine* (Fator de impacto 7.3).

Increasing of inflammatory macrophages in mothers exposed to ZIKV is correlated to High Redox Profile in Congenital Zika Syndrome

Eder M.S. Fialho MSc[1], Emanoel M. Veras[2], Caroline M. de Jesus[3], Líllian N. Gomes MSc[4], Ricardo Khouri PhD[5], Patrícia S. Sousa MD PhD[6], Marizelia R.C. Ribeiro MD PhD[7], Antônio A.M. Silva MD PhD[8]; [1,8]Flávia R.F. Nascimento PhD[1,9]; Paulo V.S. Pereira PhD[1,9*].

[1] Health Sciences Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[2] Medical School, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil

[3]Health and Technology Graduate Program, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[4] Department of Immunology, University of São Paulo, SP, Brazil.

[5] Gonçalo Moniz Research Institute – FIOCRUZ – Salvador, BA, Brazil.

[6] Department of Medicine I, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[7] Department of Medicine III, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[8] Department of Public Health, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

[9] Department of Pathology, Federal University of Maranhão, São Luís, MA, Brazil.

Corresponding author:

Paulo V.S. Pereira PhD
1966 Av. dos Portugueses, 1966
Biological and Health Sciences Center
Laboratory of Immunophysiology, Federal University of Maranhão
São Luís, MA 65085-580, Brazil
Telephone number: +55 (98) 98346-9996

Fax number: +55 (98) 3272-8701

E-mail address: paulo.soeiro@ufma.br

Abstract

Maternal Zika virus infection during pregnancy is responsible for the development of a series of fetal malformations called Congenital Zika Syndrome (CZS). The immunological mechanisms involved in the development of CZS have not been fully clarified. The hypothesis of this study is that the immunoinflammatory context of the mother during pregnancy, after contact with the virus, is transferred to the child and remains even after birth, influencing the development and worsening of the CZS. To test this hypothesis, the phenotypic profile of leukocytes and markers of oxidative stress (hydrogen peroxide and superoxide dismutase) were analyzed, as well as macrophage polarization markers (arginase and nitrites), which were compared between children with and without CZS and their respective mothers. For this purpose, blood samples were collected from children with CZS, with clinical and laboratory diagnosis confirmed through the Plate Reduction Neutralization Test (PRNT) and from their mothers (CZS+ group). Samples were also collected from children who did not develop CZS and were negative for PRNT and their mothers (group CZS-). The data demonstrated that there was a strong correlation between the leukocytes profile of CZS+ children and their mothers which was more evident in relation to the monocytes. Focusing in this cell population, it was observed that the monocytes of the mothers of CZS+ children showed less expression of HLA on the surface and greater production of hydrogen peroxide, suggesting a more inflammatory profile of these cells. On the other hand, CZS+ children did not show decreased expression of HLA, but had a higher concentration of hydrogen peroxide. This increase does not seem to be related to deficiency in the activity of antioxidant enzymes, since the activity of the superoxide dismutase enzyme was not altered neither in children nor in their mothers. Moreover, when assessing the opposite markers of monocyte polarization, it was observed that there was no difference in nitrite concentrations, however, there was a decrease in arginase activity in CZS+ children. These data suggest a maternal-fetal immune-inflammatory profile characterized by monocytes with a high oxidative response and a M1 response context. Therefore, our work brings evidence that the immunoinflammatory context triggered by the Zika Virus in the mother affects the child, not only during pregnancy, but remains altering the child's inflammatory response throughout his life and influencing the development and progression of Congenital Zika Syndrome.

Keywords: Reactive oxygen species, Microcephaly, Monocytes, Zika virus infection

Artigos produzidos a partir da tese (3)

Maiores concentrações de IL-17 em mães e crianças e severidade dos achados da tomografia computadorizada e microcefalia ao nascer na síndrome da Zika congênita.

Emanoel Moraes Veras[1]; Eder Magalhães Silva Fialho[2]; Antônio Augusto Moura da Silva[8]; Marizelia Rodrigues Costa Ribeiro[7]; Patrícia da Silva Sousa[5]; Ricardo Khouri[4]; Líllian Nunes Gomes[3]; Paulo Vítor Soeiro Pereira[9]; Flávia Raquel Fernandes do Nascimento[9*].

[1] Graduação em Medicina, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

[2]Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

[3]Departamento de Imunologia, Universidade de São Paulo, SP, Brasil.

[4] Instituto de Pesquisa Gonçalo Moniz – FIOCRUZ – Salvador, BA, Brasil.

[5]Departamento de Medicina I, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil

[7]Departamento de Medicina III, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

[8]Departamento de Saúde Pública, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

[9]Laboratório de Imunofisiologia, Departamento de Patologia, Universidade Federal do Maranhão, São Luís, MA, Brasil.

Autor para correspondência:

Profa. Dra. Flávia Raquel Fernandes do Nascimento

Campus do Bacanga, Av. dos Portugueses 1966, Prédio do Integrado, Bloco 1, Sala 1A, Laboratório de Imunofisiologia. São Luís, MA. CEP: 65085-580

Tel. 55 98 3272854

e-mail: flavia.nascimento@ufma.br

ABSTRACT

Os mecanismos imunológicos envolvidos no desenvolvimento da Síndrome da Zika congênita (CZS) ainda não foram bem estabelecidos. Este estudo analisa possíveis relações entre a produção das citocinas inflamatórias IL-6 e IL-17 em mães, crianças com CZS e controles com a presença de microcefalia ao nascer e a gravidade de lesões cerebrais na tomografia computadorizada de crânio. O diagnóstico da CZS foi feita com o teste de neutralização por redução de placas ($PRNT_{50}$) em crianças de 5 a 25 meses. A amostra foi composta por 27 casos de CZS ($PRNT_{50}$ positivo) e 30 controles ($PRNT_{50}$ negativo). A concentração plasmática das citocinas IL-6 e IL-17 foi quantificada pelo método Cytometric Bead Array (CBA). Microcefalia foi definida como perímetro cefálico (HC) < 2 desvio padrão (SD) abaixo da média para idade gestacional e sexo. As lesões cerebrais foram classificadas em leves, moderadas e graves. Houve aumento das concentrações de IL-6 e IL-17 maternas de casos com microcefalia ao nascer e em casos com presença de lesões cerebrais graves ($p < 0.05$). Quanto à produção das citocinas nos casos de CZS, apenas a IL-17 foi associada com microcefalia ao nascer ($p = 0.001$) e a presença de lesões cerebrais graves ($p < 0.001$). Esses resultados não foram observados em controles e suas respectivas mães. Os achados desse estudo sugerem que maiores concentrações de IL-17 em mães e crianças com CZS podem estar relacionadas a uma maior intensidade do processo inflamatório que leva a microcefalia ao nascer e a malformações cerebrais graves.

Palavras-chave: Ativação Imune Materna, Arbovirose, Microcefalia, Inflamação.

Apêndice 4 – Artigo publicado em colaboração.

Article

Aerobic Training Improves Inflammation and Autonomic Cardiac Control in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting? A Preliminary Study

Fabiano de Jesus Furtado Almeida[1,3,4,*], Bruno Bavaresco Gambassi[2,*#], Ana Eugênia Araújo Furtado Almeida[3,6], Raquel Moraes da Rocha Nogueira[2], Tânia Maria Gaspar Novais[3], Cândida Helena Lopes Alves[3], Flávia Raquel do Nascimento[6], Eder Magalhães Silva Fialho[6], Luiz Filipe Costa Chaves[3], Thiago Matheus da Silva Sousa[3], Bismarck Ascar Sauaia[3], Vinicius José da Silva Nina[1,5]

ALMEIDA, F. J. F.; GAMBASSI, B. B.; ALMEIDA, A. E. A. F.; NOGUEIRA, R. M. R.; NOVAIS, T. M. G.; ALVES, C. H. L.; NASCIMENTO, F R F; **FIALHO, EDER M.S.**; CHAVES, L. F. C.; SOUSA, T. M. S.; SAUAIA, B. A.; NINA, V. J. S.
Aerobic Training Improves Inflammation and Autonomic Cardiac Control in Patients Undergoing Coronary Artery Bypass Grafting? A Preliminary Study. European **Journal of Preventive Cardiology**, 2020.

Anexo