



UNIVERSIDADE DO ESTADO DA BAHIA – UNEB
PROGRAMA PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU* EM CIÊNCIAS
FARMACÊUTICAS – PPGFARMA

EMILE IVANA FERNANDES SANTOS COSTA

ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DO
GENE ADENILATO CICLASE 9 (ADCY9) E A
SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA

Salvador

2022

EMILE IVANA FERNANDES SANTOS COSTA

**ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE VARIANTES DO
GENE ADENILATO CICLASE 9 (ADCY9) E A
SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA**

Dissertação apresentada ao Programa Pós-Graduação *Stricto Sensu* Em Ciências Farmacêuticas (PPGFARMA), da Universidade do Estado da Bahia (UNEB) como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências Farmacêuticas.

Orientadora: Prof. Dr.^a Valdirene Leão Carneiro

Linha de Pesquisa: 2 - Avaliação de Fármacos, Biomarcadores e Produtos Naturais e Sintéticos

Salvador

2022

FICHA CATALOGRÁFICA
Biblioteca Professor **Edivaldo Machado Boaventura** - UNEB – Campus I

C837e

Costa, Emile Ivana Fernandes Santos

Estudo de associação entre as variantes do gene adenilato ciclase 9 (ADCY9) e síndrome congênita do Zika / Emile Ivana Fernandes Santos Costa. – Salvador, 2022.
98 f. : il.

Orientador: Valdirene Leão Carneiro.

Dissertação (Mestrado Acadêmico) – Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da vida. Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas - PPGFARMA, Campus I. 2022.

Contém referências e anexos.

1. Imunogenética. 2. Polimorfismo de nucleotídeo único. 3. Infecção por Zika vírus. 4. Infecção congênita por Zika. 5. Adenilato ciclase. 6. Genética. I. Carneiro, Valdirene Leão. II. Universidade do Estado da Bahia. Departamento de Ciências da Vida. Campus I. IV. Título.

CDD: 576.5

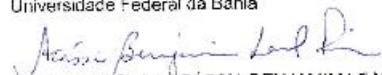
FOLHA DE APROVAÇÃO
"ESTUDO DE ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIANTES DO GENE ADENILATO CICLASE
9 (ADCY9) E A SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKA"

EMILE IVANA FERNANDES SANTOS COSTA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação *Stricto sensu* em Ciências Farmacêuticas – PPGFARMA, em 22 de julho de 2022, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Ciências Farmacêuticas pela Universidade do Estado da Bahia, conforme avaliação da Banca Examinadora:



Professor(a) Dr.(a) VALDIRENE LEAO CARNEIRO
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Imunologia
Universidade Federal da Bahia



Professor(a) Dr.(a) ACÁSSIA BENJAMIM LEAL PIRES
Universidade do Estado da Bahia - UNEB
Doutorado em Genética e Biologia Molecular
Universidade Estadual de Campinas



Professor(a) Dr.(a) TATIANE DE OLIVEIRA TEIXEIRA MUNIZ CARLETO
Universidade Federal da Bahia - UFBA
Doutorado em Processos Interativos dos Órgãos e Sistemas
Universidade Federal da Bahia

Dedicatória

Dedico esse trabalho a minha família
que sempre esteve ao meu lado, me
apoando e me dando forças para
prosseguir com meus sonhos!!

À minha mãe **Valtemiria**, por nunca
deixar de acreditar em mim, em nenhum
momento de sua vida.

À minha mana **Érica Élem**, que sempre
aturou minhas chatices.

A meus avós maternos, **Valquíria** e
Manoel Messias, que sempre
estiveram ao meu lado, ensinando o
verdadeiro valor da vida.

Aos meus padrinhos, **Valrileide** e
Anselmo, pelos conselhos, apoio e
dedicação que sempre me deram.

A meu companheiro e amigo **Ronaldo** e
a minha filha **Iara Sofia** (a grande
inspiração da minha vida), por todo
amor e carinho que me ofereceram nos
momentos em que mais precisei.

Sem vocês em minha vida nada disso
faria sentido!!

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus e a toda espiritualidade superior, por me orientar em todos os momentos dessa caminhada. Agradeço também a minha família, em especial minha mãe Valtemiria, que sempre foi um exemplo de força e coragem para mim.

Minha orientadora Dra. Valdirene Carneiro Leão, pela sua dedicação, apoio, compreensão e orientação. Obrigada por, pela paciência e empatia tão importantes nesses momentos difíceis que passamos durante a fase mais crítica da pandemia, com aulas e encontros online, em que o “reinventar-se” se fez tão necessário para o desenvolver do nosso projeto.

Agradeço ao PPG em Ciências Farmacêuticas/UNEB, em especial ao coordenador do Programa, professor Dr. Anibal de Freitas Júnior, de simpatia extraordinária, sempre acolhedor, cortês e gentil, aproximando-se dos discentes com uma energia incrível e reascendendo na juventude o desejo de seguir acreditando na Ciência, mesmo durante um momento pandêmico tão adverso e turbulento que estamos vivendo. Obrigada também a todos os colaboradores, professores e colegas, especialmente os da turma 4 (2020.1), que sempre estiveram dispostos a ajudar uns aos outros, nesse momento de tantas dúvidas e inquietações.

Agradeço ao Laboratório de Imunologia e Biologia Molecular (Imunobio/UFBA), representado pelos professores Dra. Camila Alexandrina Viana Figueiredo e Dr. Ryan dos Santos Costa, pela oportunidade de fazer parte desse grupo de pesquisadores incríveis e a todos os colegas do IMUNOBIO, em especial Louise e Raísa, pelos tantos momentos de aprendizado em nas reuniões e no laboratório. Por fim, agradeço ao PPSUS e CAPES pela oportunidade imensurável de expandir meu conhecimento durante esse período de dois anos.

“Quem acredita sempre alcança!”
Renato Russo

RESUMO

COSTA, E. I. F. S. Estudo de associação entre variantes do gene adenilato ciclase e a Síndrome Congênita do Zika (dissertação). Salvador: Departamento de Ciências da Vida (DCV), Universidade do Estado da Bahia, 2021; 98p.

Introdução: O ZIKV pertence ao gênero flavivírus, transmitido principalmente por mosquitos *Aedes*. A Síndrome Congênita do Zika é responsável por subdesenvolvimento neurológico em crianças. A proteína adenilato ciclase funciona como uma importante molécula de sinalização, envolvida em diversos processos, como a produção de AMPc. Uma forte associação entre variantes de alguns genes ADCYs e a suscetibilidade da SCZ foi observada em mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação. O grande desafio atualmente é descobrir biomarcadores que direcionem o diagnóstico e tratamento para a infecção. **Objetivos:** Identificar SNPs do ADCY9 e marcadores imunológicos em gestantes ZIKV (+) e crianças portadoras da SCZ participantes do Programa Abraço a Microcefalia. **Materiais e Métodos:** O estudo foi composto por 70 indivíduos, entre crianças com síndrome congênita do Zika e suas mães, residentes na Bahia. As coletas foram realizadas no Laboratório de Imunologia do ICS/UFBA, no ano de 2017. Neste trabalho, foi realizada a investigação de aspectos genéticos do ADCY9 e a dosagem de citocinas relacionados a via do adenilato ciclase, a fim de identificar biomarcadores envolvidos nessa infecção e seus desfechos. Além disso, foi avaliado o papel da citocina TNF- α como biomarcador da Síndrome Congênita do Zika através de uma revisão sistemática. **Resultados e Discussão:** O rs2601796 (OR 0.91) foi associado a proteção ao desfecho em estudo, porém que não podem ser considerados significativos, pois todos apresentaram valores de $p > 0.05$. Diferenças estatisticamente significativas foram encontradas para crianças com síndrome congênita grave para IL-12 ($p < 0,002$), IL-6 ($p < 0,003$) e IL-15 ($p < 0,003$), sendo bons preditores para indicar uma síndrome congênita do vírus Zika mais grave, quando comparadas a formas mais leves da doença. **Conclusão:** É necessário replicar este estudo em outras populações, com um melhor poder estatístico, para confirmar se variantes no gene ADCY9 e as citocinas TNF- α IL-2, IL-6 e IL-15 interferem na resposta imune implicando na gravidade da Síndrome Congênita.

Palavras-chave: Zika vírus; adenilato ciclase 9 (ADCY9); Síndrome Congênita do Zika vírus; biomarcadores.

ABSTRACT

COSTA, E. I. F. S. Study of the association between variants of the adenylate cyclase gene and the Zika Congenital Syndrome (dissertation). Salvador: Department of Life Sciences (DCV), University of the State of Bahia, 2021; 98p.

Introduction: ZIKV belongs to the flavivirus genus, transmitted mainly by *Aedes* mosquitoes. Congenital Zika Syndrome is responsible for neurological underdevelopment in children. The protein adenylate cyclase functions as an important signaling molecule, involved in several processes, such as the production of cAMP. A strong association between variants of some ADCYs genes and SCZ susceptibility was observed in women infected with ZIKV during pregnancy. The great challenge currently is to discover biomarkers that guide the diagnosis and treatment for the infection. **Objectives:** To identify ADCY9 SNPs and immunological markers in ZIKV (+) pregnant women and children with SCZ participating in the Abraço a Microcefalia Program. **Materials and Methods:** The study consisted of 70 individuals, including children with congenital Zika syndrome and their mothers, living in Bahia. The collections were carried out at the Immunology Laboratory of the ICS/UFBA, in 2017. In this work, the investigation of genetic aspects of ADCY9 and the dosage of cytokines related to the adenylate cyclase pathway were carried out in order to identify biomarkers involved in this infection. and its outcomes. In addition, the role of the cytokine TNF- α as a biomarker of Congenital Zika Syndrome was evaluated through a systematic review. **Results and Discussion:** The rs2601796 (OR 0.91) was associated with protection for the outcome under study, but they cannot be considered significant, as all had p values > 0.05. Statistically significant differences were found for children with severe congenital syndrome for IL-12 (p<0.002), IL-6 (<0.003) and IL-15 (<0.003), being good predictors to indicate a more severe congenital Zika virus syndrome, when compared to milder forms of the disease. **Conclusion:** It is necessary to replicate this study in other populations, with better statistical power, to confirm whether variants in the ADCY9 gene and the TNF- α cytokines IL-2, IL-6 and IL-15 interfere with the immune response, resulting in the severity of the Syndrome congenital.

Keywords: Zika virus; adenylate cyclase 9 (ADCY9); Congenital Zika Virus Syndrome; biomarkers.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADCY	Gene Adenilato Ciclase
ADCY1	Gene Adenilato Ciclase 1
ADCY2	Gene Adenilato Ciclase 2
ADCY3	Gene Adenilato Ciclase 3
ADCY4	Gene Adenilato Ciclase 4
ADCY5	Gene Adenilato Ciclase 5
ADCY6	Gene Adenilato Ciclase 6
ADCY7	Gene Adenilato Ciclase 7
ADCY8	Gene Adenilato Ciclase 8
ADCY9	Gene Adenilato Ciclase 9
ADCY10	Gene Adenilato Ciclase 10
AMPc	Adenosina Monofosfato cíclica
ATP	Adenosina Trifosfato
AXL	Receptor da Tirosina Quinase
C	Proteína Estrutural Capsídeo do Zika vírus
DNA	Ácido Desoxinucléico
DENV	Dengue vírus
E	Proteína Estrutural envelope do Zika vírus
GMPc	Guanosina Monofosfato cíclico
HIV	Vírus da imunodeficiência humana
HBV	Vírus da Hepatite B
HSV-1	Vírus do Herpes tipo 1
IFN-1	Interferon tipo 1
IFN- α /alfa	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IFN- γ	Interferon gama
IgG	Imunoglobulina G
IgM	Imunoglobulina M
IL-1 β	Interleucina 1 beta
IL-3	Interleucina 3
IL-12	Interleucina 12
ISG15	Gene 15 estimulado por interferon
MHC	Complexo de histocompatibilidade maior

mTOR	Alvo da rapamicina de mamíferos
NK	Natural Killer
NS1	Proteína não estrutural 1 do vírus Zika
NS2A	Proteína não estrutural 2A do vírus Zika
NS2B	Proteína não estrutural 2B do vírus Zika
NS3	Proteína não estrutural 3 do vírus Zika
NS4A	Proteína não estrutural 4A do vírus Zika
NS4B	Proteína não estrutural 4B do vírus Zika
NS5	Proteína não estrutural 5 do vírus Zika
OAS2	2'-5'-oligoadenilato sintetase 2
OMS	Organização Mundial da Saúde
prM	Proteína estrutural precursora de membrana do vírus Zika
RE	Retículo endoplasmático
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação da transcriptase reversa-Reação de cadeia da polimerase
SCZ	Síndrome Congênita do Zika
SGB	Síndrome de Guillain Barré
SNC	Sistema Nervoso Central
SNPs	Polimorfismos de nucleotídeo único
TCD4+	Células T CD4+
TCD8+	Células T CD8+
Th0	Células T auxiliares virgens
Th1	Células T auxiliares 1
TNF- α	Fator de necrose tumoral alfa
TNF- β	Fator de necrose tumoral beta (linfotóxina)
ZIKV	Zika vírus

LISTA DE FIGURAS E GRÁFICOS

Figura 01. Representação das proteínas estruturais, proteínas não estruturais e pontos de clivagem (setas) da poliproteína. Essas clivagens são realizadas por proteases virais e do hospedeiro.....	20
Figura 02. Representação da estrutura do ZIKV.....	20
Figura 03. Recém-nascidos apresentando malformações congênitas decorrentes de infecção materna durante o período gestacional pelo ZIKV. A, b e c apresentam artrogripose em braços e pernas; d com artrogripose apenas nos braços	25
Figura 04. Interação da partícula viral com a célula hospedeira.....	27
Figura 05. Nível de expressão do ACDY9 GTE _x) agrupados por genótipos de (A) rs2601796 e (B) rs 2532019 usando amostras de sangue total (p<0.001)	55

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 01. Descrição da população de estudo.....43

Tabela 02. Descrição dos SNPs no gene ADCY9. Da esquerda para direita: cromossomo, ID do SNP, posição, genótipo, MAF, função e score no Regulome Db.....48

Tabela 03. Frequência do rs2601796 na população europeia, africana e em diferentes coortes na população brasileira para o alelo polimórfico (A).....49

Tabela 04. Associações de regressão logística entre a variante rs2601796 do ADCY9 pelos modelos aditivo, dominante e recessivo das mães Zika (+) e Zika (-)50

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	16
2. OBJETIVOS.....	19
2.1 GERAL.....	19
2.2 ESPECÍFICOS.....	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....	20
3.1 Estrutura do ZIKV.....	20
3.2 Vetores e Ciclos do vírus.....	22
3.3 Transmissão do ZIKV.....	22
3.4 Sintomas associados a infecção pelo ZIKV.....	23
3.5 Tratamento da infecção pelo ZIKV.....	23
3.6 Testes diagnósticos para detecção do ZIKV.....	24
3.7 Doenças associadas a infecção pelo ZIKV.....	25
3.8 Fisiopatogenia do ZIKV.....	27
3.9 Resposta imune inata e adaptativa.....	29
3.10 Comportamento das citocinas durante a gravidez.....	31
3.11 A via do AMPc e sua associação com a infecção pelo ZIKV.....	34
3.12 Fatores genéticos associados a doenças.....	38
3.13 Fatores genéticos e o ZIKV.....	39
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	41
4.1 Características da população.....	41
4.2 Fonte de dados.....	42
4.3 Variáveis da pesquisa.....	42
4.4 Coleta das amostras de sangue.....	42
4.5 Extração de DNA.....	42
4.6 Seleção dos SNPs.....	44

4.7 Genotipagem das Amostras.....	45
4.8 Análise <i>in silico</i>	45
4.9 Dosagem de citocinas.....	46
4.10 Análise estatística.....	46
4.11 Aspectos éticos.....	47
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	48
6. CONCLUSÕES.....	55
REFERÊNCIAS.....	56
ANEXOS.....	67
Anexo A. Níveis plasmáticos do TNF-alfa em gestantes com infecção pelo zika vírus (ZIKV) e sua relação com gravidade da síndrome congênita: revisão sistemática e metanálise.....	67

1. INTRODUÇÃO

O primeiro relato de isolamento do Zika vírus (ZIKV) foi em 1947, encontrado no sangue de um macaco sentinela Rhesus nº 766, na região da Floresta Zika (Uganda), que era monitorado por pesquisadores (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Um ano mais tarde, o vírus foi isolado em mosquitos *Aedes africanus* (DICK, 1952) e somente em 1952 foi documentado o primeiro caso confirmado em humanos, a partir do isolamento do ZIKV em 1952 nessa mesma região (MACNAMARA, 1954).

Nessa época, o ZIKV já era responsável por infecções bem controladas, que se limitavam a alguns locais próximos à Floresta Zika. Devido ao pequeno número de pessoas acometidas pelo vírus e ao seu baixo impacto na saúde da população, não havia vigilância epidemiológica, nem pesquisas para o desenvolvimento de diagnósticos, vacinas ou tratamentos, quando comparado com outros arbovírus. Somente após um surto de ZIKV no Brasil em 2015, e sua associação com a microcefalia, cresceu a busca dos cientistas por explicações sobre a patologia desse vírus (FAUCI; MORENS, 2016).

O ZIKV pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, e apresenta uma biologia icosaédrica envelopada compartilhando semelhanças estruturais e funcionais com outros flavivírus humanos, como os vírus da dengue (DENV), do Nilo Ocidental (WNV) e da encefalite japonesa (JEV) (HASAN et al., 2018). Essa similaridade é responsável pelo efeito de reação cruzada, implicando em um sério problema de diagnóstico laboratorial entre as arboviroses, principalmente no diagnóstico diferencial entre DENV e ZIKV, já que a sintomatologia associada a eles é muito parecida (Távora, 2021).

A SCZ é um fenótipo complexo e vários fatores de risco, como as próprias características do vírus, do meio ambiente e a genética do hospedeiro, podem contribuir para sua suscetibilidade e gravidade. Fatores relacionados ao vírus incluem diversidade genética do ZIKV e eventos de coinfeção com outros arbovírus, como o vírus chikungunya (CHIKV) ou DENV (BORDA et al., 2021a). Entre os fatores do hospedeiro, já está bem descrito na literatura que a idade gestacional no momento da infecção pelo ZIKV, a resposta imune materno-fetal e a variação genética em alguns genes, como os da família adenilato e TLR3, estão associados aos desfechos da SCZ (CHEN et al., 2017; ROSSI et al., 2019).

Essa Síndrome é caracterizada por malformações cerebrais, gerando grande prejuízo ao desenvolvimento neurológico das crianças afetadas. A microcefalia é

uma das principais características da SCZ, podendo ser bem identificada pela perda de proporção no tamanho da cabeça com relação à face, dando a impressão que o rosto da criança é maior, sendo que na verdade houve um subdesenvolvimento encefálico, ou seja, ocorre o cérebro não consegue atingir o tamanho adequado. Além da microcefalia, outra característica bastante importante é conhecida com *cútis gyrata*, que consiste na formação de dobras no couro cabeludo por excesso de pele, explicado também pelo déficit do crescimento cerebral. Geralmente, essas crianças apresentam quadro de irritabilidade, tremores, convulsões, além de distúrbios oftalmológicos, deformações musculoesqueléticas, bem como dificuldades na fala e audição (MIRANDA-FILHO et al., 2016).

A comprovação da invasão do Sistema Nervoso Central (SNC) pelo ZIKV, através de experimentos com animais de laboratório, colocou todo o mundo em alerta para um novo teratógeno humano (NUNES et al., 2016). Além disso, análises histológicas em neomorto (cérebro, coração, baço, rim, pulmão, fígado e líquido cefalorraquidiano), revelou a presença do ZIKV. Posteriormente, outros estudos trouxeram evidências de que a transmissão desse vírus, também acontece via transfusional e sexual, além da vertical, que acontece de mãe para filho (HEUKELBACH et al., 2016).

A SCZ é um fenótipo raro e complexo, e a sua manifestação está associada a vários fatores de risco, econômicos, ambientais e genéticos, que podem influenciar tanto a susceptibilidade quanto a gravidade do desfecho. Já é de amplo conhecimento que a resposta imunológica é ativada durante um processo infeccioso, independente do agente etiológico. Essa é uma reação natural do organismo, que acontece a partir da interação entre as células de defesa do organismo, as condições de saúde do indivíduo e suas características genéticas. Algumas citocinas próinflamatórias, incluindo a TNF- α , IL-1 β , IL-6 e IL-12, que são liberadas durante esse processo parecem ser responsáveis pela instalação de um quadro neuroinflamatório que foi descrito em alguns trabalhos que investigaram a relação entre os níveis plasmáticos dessas citocinas com a ocorrência e/ou gravidade da SCZ (COSTA et al., 2021; DELGADO; LECETA; GANEA, 2003; KAM et al., 2017; LUM et al., 2019).

Estudos das variantes genéticas, principalmente os polimorfismos de um único nucleotídeo (SNPs), podem fornecer informações importantes relacionadas a

heterogeneidade de diversas doenças e inclusive, podem ser utilizadas como biomarcadores de ocorrência ou gravidade de um determinado desfecho. Vallada Filho; Samaia (2000) demonstraram que a esquizofrenia não é um evento aleatório, e sua ocorrência, possivelmente está ligada a fatores multigênicos, que podem também ser a explicação para a SCZ.

Um estudo pioneiro utilizando gêmeos monozigóticos, onde apenas um dos irmãos desenvolveu a SCZ, apesar de ter sido exposto às mesmas condições no ambiente intrauterino que o outro, trouxe à discussão uma possível herança recessiva e multifatorial desse desfecho (BORDA et al., 2021b; CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). Além disso, uma forte associação entre variantes dos genes ADCY3, ADCY7 e ADCY10 com o aumento suscetibilidade de desenvolver a SCZ, foi observada em mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação (ROSSI et al., 2018). A literatura também relata associações de polimorfismos em genes ADCY associados com outras doenças inflamatórias, como a asma (TEIXEIRA et al., 2017), a doença inflamatória intestinal (BRANT et al., 2017), e o câncer (WARRINGTON et al., 2015; XIE et al., 2017).

Somente no ano de 2015 foram diagnosticados aproximadamente 1,3 milhão de casos da infecção pelo ZIKV no Brasil (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2015), sendo 3,45% desses casos associados a ocorrência de microcefalia em crianças que as mães foram infectadas pelo vírus durante a gestação (BRASIL, 2015a). Apesar dos casos de infecções pelo vírus terem reduzidos nos últimos anos, ele continua sendo um potente causador de defeitos congênitos. Logo, a circulação do ZIKV na sociedade é de grande preocupação para as autoridades sanitárias, principalmente nos países pobres, onde não se tem condições adequadas de saneamento básico, o que os torna locais propícios para infestações dos mosquitos transmissores (CAMPOS et al., 2020; REBOREDO et al., 2021).

Diante do impacto social causado pelo ZIKV, o grande desafio atualmente é descobrir biomarcadores que possam direcionar corretamente o diagnóstico e tratamento para a infecção. Sendo assim, neste trabalho pretendemos avaliar polimorfismos genéticos do ADCY9 e marcadores imunológicos em gestantes infectadas pelo ZIKV e crianças portadoras da SCZ.

2. OBJETIVOS

2.1 GERAL

Identificar polimorfismos genéticos do ADCY9 e marcadores imunológicos em gestantes infectadas pelo ZIKV e crianças portadoras da SCZ participantes do Programa Abraço a Microcefalia.

2.2 ESPECÍFICOS

- Identificar polimorfismos no gene ADCY9 associados com a Síndrome Congênita do Zika que possam ser usados como biomarcadores genéticos;
- Associar o perfil de citocinas inflamatórias em crianças portadoras da SCZ com variantes do gene ADCY9.
- Verificar a associação do aumento da expressão de TNF-alfa em gestantes com infecção pelo ZIKV e a ocorrência da Síndrome Congênita.

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

3.1. Estrutura do ZIKV

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivírus*, da família *Flaviviridae* e está inserido no grupo dos arbovírus, que são vírus transmitidos por artrópodes (mosquitos e carrapatos). A organização genômica desse vírus consiste em um RNA fita simples de sentido positivo com 10794 kb de comprimento apresentando 2 regiões não codificadoras flanqueadas (5' e 3' NCR) e uma única leitura aberta longa codificação de quadros de uma poliproteína: 5'-C-prM-e-NS1-NS2A-NS2B-NS3-NS4A-NS4B-NS5-3'. As três proteínas estruturais: precursora de membrana (prM), envelope (E) e capsídeo (C) e outras sete proteínas não estruturais: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (Figuras 1 e 2), são responsáveis pelos processos de tradução e replicação do material genético viral, utilizando como suporte a maquinaria da célula hospedeira (FAYE et al., 2014; KUNO; CHANG, 2007).

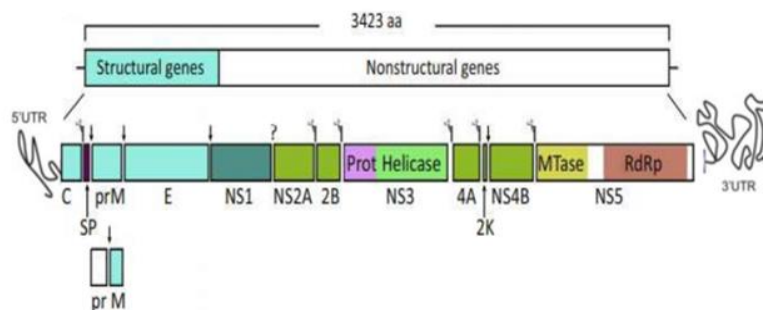


Figura 1: Representação das proteínas estruturais, proteínas não estruturais e os pontos de clivagem (setas) da poliproteína. Essas clivagens são realizadas por proteases virais e do hospedeiro (Adaptado de SHI; GAO, 2017).

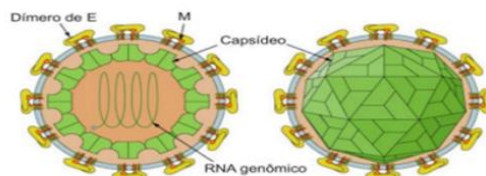


Figura 2: Representação da estrutura do ZIKV (Adaptado de DA SILVA et al., 2017).

As proteínas não estruturais NS2B e NS3 são responsáveis pela clivagem da poliproteína viral em seus componentes, logo após o processo da tradução e a proteína E é quem interage com o receptor do hospedeiro, garantindo a invasão da célula e replicação viral (CHANG et al., 2016). Além do ZIKV, outros arbovírus transmitem doenças em humanos e animais que são bastante conhecidas, como por exemplo a Febre Amarela (FA), DENV e a Chikungunya (CHIV). A infecção viral pode levar a desfechos neurológicos graves em pacientes adultos, como a SGB e a

síndrome congênita que gera defeitos congênitos em fetos expostos ao patógeno durante o período gestacional (FAUCI; MORENS, 2016; SHI; GAO, 2017).

Existem evidências da existência de duas linhagens do ZIKV, uma africana e outra asiática, que podem ser diferenciadas entre si através da análise detalhada de suas sequências de RNA e por regiões da proteína NS5 (CHANG et al., 2016). É provável que o vírus seja de origem da África Oriental, que se espalhou para a parte Ocidental da África e posteriormente para a Ásia, dando espaço a diversas linhagens que podem ser vistas atualmente. Todas as cepas encontradas nos surtos das Américas pertencem a linhagem asiática, possuindo bastante semelhança com as cepas de Yap, Camboja, Tailândia e Polinésia Francesa. Identificar essas semelhanças entre as cepas de todo o mundo é de grande importância para o desenvolvimento de testes diagnósticos e vacinas, já que dessa maneira, facilitaria a identificação e proteção de qualquer dessas cepas (PETERSEN et al., 2016).

Uma importante evolução genética da cepa original, descrita pela 1ª vez em primatas de Florestas da África Ocidental (1952), foi responsável por surtos de infecções humanas com grande abrangência geográfica mundial. Essas recombinações genéticas conferiram ao ZIKV um aumento da sua capacidade de invasão das células epiteliais humanas através da reestruturação da sua proteína estrutural E viral. Além disso, parece que o ZIKV adquiriu padrões de proteção, que diminuem o seu reconhecimento pelo organismo hospedeiro, através de uma menor estimulação da resposta imunológica e inflamatória, o que pode estar relacionado aos quadros assintomáticos da infecção (DA SILVA et al., 2017; FAYE et al., 2014).

A proteína E se organiza em dímeros com estrutura eicosaédrica (figura 2) contendo cerca de 53 KDa e representa a principal proteína estrutural do ZIKV, justamente por intermediar a fusão da partícula viral aos receptores de membrana do hospedeiro. Além disso, o meio ácido no interior dos endossomos induzem a alterações conformacionais nessas proteínas, levando a liberação da fita de RNA viral no citoplasma da célula hospedeira (DA SILVA et al., 2017).

3.2. Vetores e Ciclos do vírus

O vírus possui como seus vetores os mosquitos hematófagos, principalmente da espécie *Aedes aegypti*. Outras espécies do gênero *Aedes* estão envolvidas na transmissão, como *Aedes africanus* e *Aedes albopictus*, bem como outros insetos,

como o *Anopheles spp.* e *Cules spp.* No ciclo silvestre, os seres humanos são hospedeiros acidentais, tendo os primatas não humanos (macacos) como seus principais hospedeiros e no ciclo urbano, o homem é o hospedeiro primário e atua como grande reservatório desses vírus (SALAZAR et al., 2016; CIPRIANO; MONTEIRO, 2016).

3.3. Transmissão do ZIKV

A principal via de transmissão do vírus é através de vetores artrópodes (como mosquitos e carrapatos), porém sabe-se que existem outras maneiras da infecção acessar as células hospedeiras, sendo elas: sexual, perianal, congênita, transfusional ou transplante, e ainda por outras secreções corporais como a saliva, o suor e a urina (RODRIGUEZ-MORALES; ESPINOZA-FLORES, 2017). Geralmente o vírus não causa doença no hospedeiro natural, a exemplo dos macacos, sendo necessária uma carga viral suficiente para ser passada do vetor para o hospedeiro não natural, nesse caso o homem. Neste, observamos a ocorrência de doenças graves, como a SCZ, que provocam desordens neurológicas graves em crianças e raramente evoluem para morte do hospedeiro, e a SGB, que é uma doença autolimitante, altamente inflamatória que geralmente acomete os membros superiores e inferiores de indivíduos adultos (CHANG et al., 2016).

Em 2013, no Tahiti, um estudo identificou presença de material genético ZIKV no sêmen de homem de 44 anos com prostatite que apresentava sintomas de astenia, febre alta e artralgia (MUSSO et al., 2015). No ano de 2016, outro homem de 30 anos, também com prostatite, relatou que durante sua passagem pelo Haiti, apresentou quadro febril, astenia e erupção cutânea eritematosa, tendo 4 dias depois dos sintomas iniciais, a confirmação através da IgM específica para ZIKV. Após 6 meses foi encontrado material genético do ZIKV em seu sêmen (NICASTRI et al., 2016).

A infecção dos neonatos ocorre ainda durante o seu desenvolvimento intrauterino, através da passagem do vírus pela placenta, ou no momento do parto quando o bebê passa pelo canal vaginal. Houve um aumento no número de casos de microcefalia associados a infecção materna durante a gravidez, sugerindo a possível infecção congênita do vírus. Análises de tecidos fetais de crianças que tiveram óbito logo após o nascimento, apresentaram partículas virais, demonstrando a

capacidade que o ZIKV passar da mãe para o bebê através da barreira transplacentária (CIPRIANO; MONTEIRO, 2016).

3.4. Sintomas associados a infecção pelo ZIKV

Os sintomas associados a esse agente infeccioso são muito semelhantes ao de outros quadros virais, ou seja, não são específicos para determinar diagnóstico para o ZIKV, geralmente o indivíduo apresenta um quadro febril, bastante leve, ou até mesmo ausência da febre. Seu período de incubação é de aproximadamente 10 dias, e a maioria dos casos, acontece de maneira assintomática, em torno de 80%. Conjuntivite, mialgia, erupção maculopapular, rash cutâneo, dor de cabeça e artralgia também foram relacionados ao quadro da infecção pelo ZIKV (CHANG et al., 2016).

Diferente da infecção pelo DENV, o quadro gerado pelo ZIKV não tem, até o momento, relatos de hemorragias, como é comumente descrito nos casos mais graves da dengue (TAPPE et al., 2016). Mesmo sendo considerada inicialmente uma infecção sem complexidade, pode levar a desfechos como SGB ou SCZ, que podem causar problemas neurológicos graves, em crianças e adultos, o que provavelmente está relacionado ao fator genético do hospedeiro (LAERTE PINTO JUNIOR et al., 2015).

3.5. Tratamento da infecção pelo ZIKV

O tratamento medicamentoso utilizado para os casos de infecção pelo ZIKV é de suporte, tendo como objetivo amenizar os sintomas associados ao quadro, além de indicação de hidratação e repouso. Para os quadros de maiores gravidades, como SGB ou SCZ, a conduta deve ser avaliada por profissional médico, no âmbito hospitalar, e muitas vezes segue com acompanhamento multiprofissional, à nível ambulatorial. Há indicação para uso de imunoglobulinas em adultos acometidos com inflamação neurológica decorrente da SGB e de anticonvulsivantes em crianças com microcefalia devido a SCZ (FAYE et al., 2014; PETERSEN et al., 2016).

Não existem vacinas para proteger a população contra o ZIKV, logo medidas de prevenção e controle do agente se baseia, principalmente, em eliminar o mosquito transmissor do vírus, através da redução dos seus focos de proliferação, utilização de repelente em gestantes, além de programas educacionais de

prevenção veiculados por órgãos do governo, no sentido de conscientizar a população para esse importante problema de saúde pública (PETERSEN et al., 2016).

3.6. Testes diagnósticos para detecção do ZIKV

O diagnóstico não específico é feito baseado nos sinais clínicos tais como: dor, febre e urticária, erupção cutânea com papilas pruriginosa, conjuntivite, mialgia, cefaleia e podem ser realizados exames laboratoriais, principalmente aqueles que determinam atividades inflamatórias (como Proteína C reativa, fibrinogênio e ferritina) e isolamento de RNA viral, através da técnica de RT-PCR, para chegar a um diagnóstico definitivo da infecção pelo ZIKV (BRASIL, 2015a; RODRIGUEZ-MORALES; ESPINOZA-FLORES, 2017).

O material utilizado para detecção do vírus através da técnica do RT-PCR pode ser sangue, saliva, urina, líquido e líquido amniótico. E apesar dessa técnica ser considerada padrão ouro para identificação das partículas virais, o seu diagnóstico é dificultado pela baixa carga viral do ZIKV, sendo a técnica desenvolvida com maior sucesso nos primeiros dias de infecção, entre os primeiros sete dias (BRASIL, 2015a).

É importante destacar que o diagnóstico do ZIKV também é bastante realizado pela detecção do IgM e IgG através da técnica de Imunoensio enzimático – Elisa. Porém, há uma grande desvantagem na realização desse teste, devido a importante reatividade cruzada com outros flavivírus, especialmente com o vírus dengue. Por isso, os resultados do Elisa devem ser interpretados com bastante cuidado pelos profissionais de saúde (PETERSEN et al., 2016).

3.7. Doenças associadas a infecção pelo ZIKV

SGB é uma doença autoimune que acomete braços e pernas devido a destruição dos neurônios periféricos das regiões citadas serem atacados pelo sistema imunológico do próprio indivíduo, resultando numa paralisia dos membros. Há uma provável relação entre o ZIKV e a encefalite, bem como com a mielite transversa (ANAYA et al., 2017).

A SCZ acomete recém-nascidos que suas mães foram infectadas pelo vírus

no período da gestação, apresentando como sinais clínicos microcefalia, hidrocefalia e artrogripose (Figura 3), refletindo em crescimento defeituoso, retardo no desenvolvimento neurológico, convulsões, dificuldades auditivas e oftalmológicas (RODRIGUEZ-MORALES; ESPINOZA-FLORES, 2017).



Figura 3: Recém-nascidos apresentando malformações congênicas decorrentes de infecção materna durante o período gestacional pelo ZIKV. a, b e c apresentam artrogripose em braços e pernas; d com artrogripose apenas nos braços. Adaptado de ESPINOZA (2017).

A microcefalia é descrita, em diversos estudos, como uma malformação congênita que apresenta como principal característica o perímetro cefálico diminuído 2 ou mais desvios-padrão, comparado ao valor esperado para as variáveis tempo de gestação e sexo. Na maioria dos casos, a redução desse tamanho cerebral é acompanhada de uma deficiência no desenvolvimento das funções neurais, acarretando um comprometimento nas funções motoras e cognitivas importantes (BRASIL, 2015b; FRANÇA et al., 2018).

A microcefalia pode ser classificada em: a) congênita ou microcefalia primária, quando o recém-nascido apresenta esse fenótipo desde o nascimento, e b) pós-natal ou microcefalia secundária, quando a criança nasce com cérebro de tamanho normal, e após algum tempo apresenta falhas no desenvolvimento cerebral (BRASIL, 2015b).

O acompanhamento pré-natal iniciado ainda no 1º trimestre é essencial para identificar possíveis fatores de risco que possam prejudicar o desenvolvimento fetal (BRASIL, 2015b). A confirmação de microcefalia associada ao ZIKV durante a gestação, pelo médico assistente, pode ser realizada das seguintes maneiras:

1) ultrassonografia identificando feto com alterações no SNC características de infecção congênita + relato de exantema materna durante a gestação + exclusão de

outras possíveis causas (infecciosas ou não);

2) ultrassonografia identificando feto com microcefalia apresentando alterações no SNC características de infecção congênita + relato de exantema materno durante a gestação + exclusão de outras possíveis causas (infecciosas ou não);

3) aborto espontâneo de gestante com relato de exantema durante a gestação + exclusão de outras causas + isolamento do vírus em tecido fetal ou na mãe.

As malformações neurológicas associadas vão além do não atingimento do perímetro cefálico fetal. De fato, a microcefalia representa a manifestação mais frequente que o recém-nascido pode apresentar, porém a SCZ pode se apresentar causando deformidades oculares, articulares e de membros superiores e/ou inferiores (PETRÔNIO et al., 2018; WERNER et al., 2016). A gravidade dessas malformações é bastante variada, e de alguma maneira está associada ao período gestacional da mãe no momento do contato com o ZIKV (CHEN et al., 2017; DUARTE et al., 2017). O estudo de Brasil et al. (2016) menciona que um fator de risco relevante para a manifestação da SCZ é a ocorrência da infecção durante o primeiro trimestre da gestação. Os autores trazem que este período da gravidez representa quase duas vezes mais chances de desfechos graves nos bebês quando comparado ao grupo de gestantes que tiveram contato com o ZIKV durante o terceiro trimestre. Os fatores maternos e/ou fetais que contribuem para esses desfechos de neurológicos nas crianças ainda não estão totalmente elucidados.

Esses episódios só foram rapidamente detectados no Brasil devido à existência de um sistema de vigilância da saúde fortemente atuante, o que permitiu uma detecção imediata dos casos, com notificação para os órgãos sanitários brasileiros e para a OMS, caracterizando a infecção como uma emergência de saúde pública (GARCIA, 2018).

3.8. Fisiopatogenia do ZIKV

Neurogênese consiste no processo de diferenciação das células tronco neurais ou células progenitoras neurais em células funcionais conhecidas como neurônios (LIANG et al., 2016). Esse processo ocorre ainda na fase intrauterina, e vários estudos sugerem que a exposição a determinadas infecções virais pode induzir alterações genéticas, modificando essa dinâmica de maturação das células

neurais, e consequentemente culminando em diversas desordens neurológicas nos indivíduos (LIANG et al., 2016; MING; SONG, 2011).

Sabe-se pouco sobre a patogenia da infecção pelo ZIKV, mas foi percebido um forte tropismo cutâneo. A pele funciona como importante porta de entrada para a partícula viral, sendo a proteína E responsável por se ligar aos receptores específicos, principalmente o receptor da tirosina quinase (AXL), presente em níveis bastante significativos nas células precursoras neurais, permitindo uma interação à nível de membrana e posterior entrada do vírus na célula hospedeira, por endocitose. Posteriormente, a partícula viral, que está dentro de uma vesícula, tem seu capsídeo rompido e o material genético é transferido para o citoplasma da célula hospedeira, alcançando o retículo endoplasmático (RE), local onde ocorrem os processos de tradução do genoma em uma poliproteína e de replicação da fita simples do RNA viral. Posteriormente a etapa de formação da proteína, esta passa por um processo de clivagem realizado por proteases hospedeiras e virais, com a finalidade de multiplicar o genoma viral e assim garantir a disseminação da sua população. Uma vez ocorrendo propagação das partículas do ZIKV, a célula hospedeira entra em apoptose liberando-as, permitindo assim que elas invadam a corrente sanguínea levando às manifestações clínicas associadas a infecção (figura 4) (CHRISTIAN; SONG; MING, 2019; GHOUZZI et al., 2017; OKAMOTO et al., 2017; RODRIGUEZ-MORALES; ESPINOZA-FLORES, 2017).

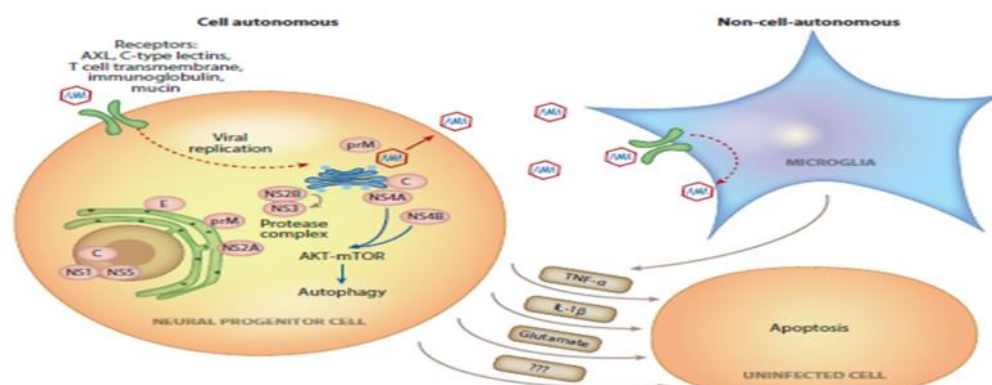


Figura 4: Interação da partícula viral com a célula hospedeira. Adaptado de CHRISTIAN; SONG; MING, 2019.

Estudo realizado por Bhagat et al. (2018), utilizou tecidos cerebrais de fetos humanos, após consentimento das mães, investigou a relação entre a proteína E do Zika vírus e a modulação dos circuitos microRNA. Ele evidenciou que a proteína E viral interage com proteínas das células progenitoras neurais fetais humanas culminando na diferenciação imatura e parada do ciclo celular. Zhang et al. (2016)

utilizaram diferentes cepas de ZIKV e DENV para infectar mosquitos do Aedes, que foram adicionadas a culturas de células progenitoras neurais humanas, e após sequenciamento dos RNAs virais e análises bioestatísticas, eles chegaram à conclusão de que a infecção pelo ZIKV ativa a via das caspases, induzindo a morte celular.

De acordo com Espinoza (2017), há uma afinidade do vírus pelas células neurais, hepáticas, renais, cardíacas, do baço, pois foi detectado RNA viral em todos esses locais. Ao infectar a gestante, o ZIKV é transferido para o feto através da placenta, atingindo as células progenitoras neurais, devido seu forte tropismo por elas, que passam por um processo de diferenciação imatura. Parte dessas células entra, em apoptose e a população das células progenitoras restantes, que está reduzida, passa por depleção e ocorre a maturação resultando em um número reduzido células neurais como axônios, oligodendrócitos e astrócitos. No momento em que esses eventos são somatizados, culminam em malformação do sistema neuralfetal e microcefalia em bebês (ROTHAN et al., 2018).

A ativação de da via PI3K-Akt-mTOR é essencial no processo de neurogênese, tanto para a migração quanto para a maturação dos grupos celulares envolvidos. Além disso, ela exerce um papel crucial na sobrevivência celular, processo conhecido como autofagia, diante da inflamação desencadeada pela presença de um agente infeccioso (SHAFIT-ZAGARDO; GRUBER; DUBOIS, 2018).

O complexo de proteínas mTOR desempenha um importante papel na expressão do TNF- α induzido por antígenos, e ativa a micróglia, podendo desencadear diversos processos neurológicos. Além disso, o TNF- α age com outros fatores de crescimento em resposta a sinais intrínsecos e extrínsecos, regulam a atividade do mTOR, especificamente a subunidade mTORC1. De alguma maneira o complexo mTOR, juntamente com o TNF- α , desregulam o processo fisiológico de autofagia, induzindo a neuroinflamação e alterando o fenótipo da micróglia M1 devido a presença do ZIKV (REBOREDO et al., 2021). Logo, a ocorrência de mutações que atinjam especificamente o mTOR, presente na via anteriormente citada, leva a inibição desse complexo, podendo afetar o desenvolvimento cerebral de tal maneira que induzam a microcefalia(CHRISTIAN; SONG; MING, 2019; CLOËTTA et al., 2013).

Adenilatos ciclases (ACs) transmembrana são enzimas que estão envolvidas na regulação de diversos processos cerebrais, como sinapse e memória, por

exemplo. Essas enzimas participam da síntese adenosina monofosfato cíclica intracelular (AMPc) a partir da adenosina trifosfato (ATP), após ativação de receptores da proteína G. Os níveis do AMPc funcionam como reguladores da imunidade inata e adaptativa, e os patógenos tiram proveito desse mecanismo do organismo hospedeiro e usam esse processo como escape da barreira imunológica hospedeira. Ao invadir as células humanas, o ZIKV estimula a produção do AMPc, através da ativação dos genes ADCY, e em seguida proteínas adenilato ciclases (AC), que enviam sinais para as células de defesa iniciarem o processo de liberação de citocinas. Com isso, ocorre um processo inflamatório à nível da micróglia, e o local se torna mais propício para a entrada do ZIKV e persistência viral nas células locais (GHOSH et al., 2012a; SANABRA; MENGOD, 2011).

3.9. Resposta imune inata e adaptativa

O sistema imune trabalha em constante equilíbrio com a finalidade de proteger o corpo humano. As células que compõem esse sistema apresentam grande importância na homeostase metabólica, criando um perfil de citocinas de acordo com as necessidades fisiológicas inerentes ao indivíduo. No entanto, esse perfil de citocinas é modificado em resposta a agentes externos, como infecções, doenças, traumas, ou mesmo em processos normais, como a gravidez (SARAFANA et al., 2007; CRUVINEL et al., 2010; ABU-RAYA et al., 2020). As citocinas são proteínas sinalizadoras que regulam os processos biológicos ao longo da gravidez, desde a implantação até o parto. O primeiro trimestre é um estágio vulnerável da gravidez, pois as complicações podem estar relacionadas ao desenvolvimento anormal da placenta, quadros infecciosos, intoxicações entre outras situações (Spence et al., 2021).

A resposta imune materna é essencial para o sucesso da gravidez, promovendo tolerância imunológica ao feto, e mantendo a imunidade inata e adaptativa para prevenir a invasão de patógenos. O comportamento dessas citocinas no curso da gravidez é bastante importante para predizer se o desenvolvimento fetal está normal ou não, já que esses padrões de citocinas maternas refletem a atuação do sistema imunológico. O mecanismo como isso acontece ainda não está totalmente elucidado, mas o que se sabe é tais variações podem ser induzidas por infecções virais e/ou bacterianas, agentes tóxicos, entre outros fatores ambientais, podem levar a partos prematuros, abortos ou anomalias

fetais. Respostas pró e anti-inflamatórias exacerbadas e descontroladas são fatores que contribuem para diversas patologias no feto (ABU-RAYA et al., 2020). A inflamação ocasionada por esse desequilíbrio altera a expressão de genes, e com isso compromete o desenvolvimento cerebral do feto, podendo resultar em alterações congênitas, como a microcefalia (SMITH et al., 2007).

Quando as partículas virais invadem as células hospedeiras, a resposta imune inata é ativada através da produção de citocinas interferons tipo 1 (subdivididas em IFN- α e IFN- β) pelas células infectadas, macrófagos e células Natural Killer (NK), as últimas produzem as substâncias citotóxicas granzimas e perforinas. A liberação dessas citocinas IFN-1 ativa a resposta imune adaptativa a partir da liberação de IL-12 por células apresentadoras de antígenos, principalmente os macrófagos, que estimulam a diferenciação das células Th0 (T helper virgens) em células Th1, e estas secretam IL-12, IFN- γ , TNF- α e TNF- β e IL-3. O IFN- γ tem a função de ativar mais macrófagos e células NK, com o objetivo de destruir as células infectadas e eliminar o patógeno (PINHEIRO et al., 2019).

O AMPc é um potente inibidor da resposta imunológica das células T, portanto agentes que aumentem sua produção atuam inibindo processos de ativação, proliferação, atividade citolítica das células T, além de reduzir a liberação de citocinas Th1, como IL-2, IL-12, IFN- γ e TNF- α . Em contrapartida, algumas citocinas envolvidas na resposta Th2, como IL-4, IL-5, IL-6 e IL-10 podem ter seus níveis aumentados (ERRANTE et al., 2018)

A resposta imune adaptativa continua a partir da ativação das células TCD8+, que são responsáveis por reconhecer partículas virais via MHC classe I, com posterior liberação de enzimas que tem o papel de destruir as células infectadas com o vírus. Além disso, adicionalmente, ocorrerá a ativação das células do tipo TCD4+, que auxiliam as células B na produção de anticorpos neutralizantes que se ligam às partículas virais no ambiente extracelular, impedindo que os vírus infectem células sadias, ou atrair as células NK para destruição de células infectadas pelo vírus (MACHADO et al., 2004; RODRIGUEZ-MORALES; ESPINOZA-FLORES, 2017).

A resposta imune associada a entrada do ZIKV na célula hospedeira se dá pela secreção de interferons tipo 1 e tipo 2, que irão estimular a expressão de genes, como OAS2 e ISG15, responsáveis pelas respostas antivirais. Essas respostas

ocorrem de maneira semelhante entre o grupo dos flavivírus, e os anticorpos neutralizantes produzidos contra as proteínas virais desempenham um papel muito importante na defesa do organismo (POLAND et al., 2018). Os anticorpos produzidos para combater o ZIKV são direcionados contra as proteínas estruturais E e M, contra a proteína não estrutural NS1. Quando a proteína estrutural E do ZIKV é comparado a outros flavivírus, como o DENV, fica evidente que por essas proteínas possuírem bastante similaridade entre seus genomas, o que determina uma alta reatividade cruzada desses anticorpos que são produzidos pelo hospedeiro (KEASEY et al., 2017).

3.10. Comportamento das citocinas durante a gravidez

A importância do sistema imunológico materno na manutenção de uma gravidez saudável já é bastante estudada. Sabe-se que ele tem um papel crucial na tolerância imunológica ao feto, mantendo os níveis das citocinas em equilíbrio, e dessa forma as respostas inatas e adaptativas são controladas para prevenir a invasão de patógenos. Portanto, a imunidade materna desempenha papel fundamental para o desenvolvimento da gravidez, particularmente, as células natural killer (NK) uterinas atuam no local de implantação e na barreira materno-fetal, mediando processos envolvidos na sobrevivência do feto até o nascimento. A supressão imunológica sistêmica e local materna, falta de antígenos do complexo principal de histocompatibilidade (MHC) no tecido fetal, e a troca da resposta Th1 pela Th2 (citocinas antiinflamatórias) materna no período inicial da gravidez, são exemplos de eventos favoráveis a gestação (MORELLI et al., 2015; SPENCE et al., 2021). Koch

Como já foi mencionado, citocinas são proteínas sinalizadoras que direcionam os processos biológicos ao longo da gravidez, desde a implantação até o parto. O primeiro trimestre é um estágio vulnerável da gravidez, pois as complicações podem estar relacionadas ao desenvolvimento anormal da placenta. Enquanto a implantação e o desenvolvimento placentário são processos pró-inflamatórios, a resposta imune materna atua no controle da inflamação por meio de mediadores regulatórios e anti-inflamatórios (REIJNDERS; GMGJ MULDER; KOSTER, 2018; SPENCE et al., 2021; STOKKELAND; GISKEØDEGÅRD; STRIDSKLEV, 2019). A seguir estão descritas algumas citocinas envolvidas na resposta imune contra o

ZIKV:

Interferon-gama (IFN- γ) é uma citocina pró-inflamatória secretada como parte da resposta imune a padrões moleculares associados a danos (DAMPs) ou padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs), pelas células imunes, como as natural killer (NK) e Th1. Essa proteína quando ativa interage com um receptor heterodimérico IFN - γ R1 e IFN- γ R2, resultando na ativação da via de sinalização JAK-STAT responsável pela regulação das respostas imunes. O IFN - γ é um mediador crucial na resposta a vários patógenos virais e tumores. Na barreira placentária, essa citocina contribui para o estabelecimento e manutenção de uma gravidez saudável, mediando a remodelação vascular endometrial e a angiogênese. Sabe-se que processos infecciosos alteram o perfil de secreção das citocinas em geral, e particularmente a atividade antiviral que o IFN - γ possui no controle dos quadros de infecções é um fator importante que pode refletir a produção do IFN na inflamação (ROSS et al., 2016; SPENCE et al., 2021; SUBHA et al., 2016).

O fator de necrose tumoral TNF - α é uma citocina pró-inflamatória codificada pelo cromossomo 6 e atua através de receptores de TNF (TNFR1 e TNFR2) expressos pela maioria das células do sistema imune. Além de seu papel fundamental nas respostas às infecções, também é um importante regulador da função celular normal, influenciando processos biológicos vitais, incluindo proliferação celular, apoptose e a produção de outras citocinas como IL-6. A apoptose é um processo crítico para regular a sobrevivência das células trofoblásticas da placenta na gravidez normal, sendo mediada pela ligação do TNF - α ao TNFR1 por meio de interações com a proteína adaptadora TRADD e o domínio de morte associado ao fas (FADD). A sobrevivência celular também é modulada por essa citocina, através da ligação do TRADD ao fator associado ao receptor de TNF (TRAF). Na gravidez saudável, as concentrações séricas de TNF - α materno são significativamente maiores no segundo e terceiro trimestres em comparação com o primeiro, sendo essas concentrações aumentadas de maneira controlada à medida que a gestação progride, ajustadas de acordo com as necessidades metabólicas associadas à gravidez (ALIJOTAS-REIG et al., 2017; CESARIS et al., 1998; MORELLI et al., 2015; NAYAK et al., 2017).

A interleucina-6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória amplamente produzida por monócitos e macrófagos, mas também por outras células imunes e não imunes,

incluindo células T e células do endotélio. Na resposta imune inata, os macrófagos secretam IL-6 em resposta a PAMPs que estão ligados a receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) e uma quando liberada, essa citocina estimula os hepatócitos a produzirem proteínas de fase aguda, como a proteína C-reativa (PCR), promovendo inflamação. A IL-6 também está envolvida na implantação do embrião e o desenvolvimento placentário e suas concentrações no soro materno aumentam significativamente durante a gravidez saudável. Alguns estudos relataram concentrações de IL-6 significativamente mais altas no terceiro trimestre em comparação com amostras coletadas no início da gravidez. Amostras repetidas na primeira metade da gravidez saudável mostraram que as concentrações de IL-6 diminuem entre o primeiro e o segundo trimestres (BJÖRKANDER; BREMME; PERSSON, 2012; BLACKMORE et al., 2011; SIMAVLI et al., 2014; STOKKELAND; GISKEØDEGÅRD; STRIDSKLEV, 2019).

A interleucina-1 beta (IL-1 β) é semelhante em estrutura e função à IL-1 α , e ambas as proteínas são codificadas por genes localizados no cromossomo 2 e atuam através da ligação ao receptor de IL-1 tipo 1 (IL-1R1) gerando respostas pró-inflamatórias. Em resposta a estímulos, incluindo DAMPs ou PAMPs, a IL-1 β é secretada por células imunes, como monócitos e macrófagos. Ela é uma citocina Th1, mas também está associada a respostas Th17 e os dados existentes sugerem que a IL-1 β está tipicamente presente em baixas concentrações no soro materno durante a gravidez saudável (GARLANDA et al., 2013; LOPEZ-CASTEJON; REVIEWS, 2011).

A interleucina-2 (IL-2) é uma citocina pró-inflamatória, atua ligando-se ao IL-2R, influenciando a diferenciação de linfócitos T em células T efectoras e de memória, bem como células T reguladoras que são importantes para prevenir a autoimunidade. Evidências sugerem que há uma redução significativa nas concentrações séricas de IL-2 materna entre o primeiro e o terceiro trimestre de gravidez saudável. Embora os dados existentes sobre as concentrações de IL-2 no soro materno sejam limitados e podem ser devido à dificuldade em detectar a citocina em gravidez saudável, alguns estudos notaram concentrações abaixo de um valor mínimo de detecção. Geralmente quando ocorre em concentrações mais elevadas está associada a mulheres que desenvolvem complicações na gravidez

(BJÖRKANDER et al., 2012; HOLTAN et al., 2015; MOSIMANN et al., 2013; ROSS; IMMUNOLOGY; 2018, 2018).

3.11. A via do AMPc e sua associação com a infecção pelo ZIKV

O AMPc foi identificado em 1957 como um segundo mensageiro intracelular capaz de estimular as células T a partir de ligantes extracelulares, como os vírus, mediando efeitos das prostaglandinas, adenosina, histamina, agosnistas β -adrenérgicos, hormônios neuropeptídeos, e β -endorfinas. Quando esses agentes interagem com receptores acoplados à proteína G (GPCRs), induzem alterações conformacionais que liberam as subunidades da proteína G e ativam as proteínas adenilato ciclases (ACs), que são responsáveis pela reação de hidrólise que transforma ATP em AMPc (MONSENDEN; TASKEN, 2010).

ACs são agrupados em seis classes diferentes (classe I-VI) com base em suas organizações estruturais e de domínio. A classe I é do tipo gama-proteobacteriano encontrado principalmente em bactérias gram-negativas, como *Escherichia coli*. A classe II existe em patógenos que secretam proteínas de toxina, incluindo *Bordetella pertussis* e *Bacillus anthracis*. A classe III é a classe universal ou ancestral de ACs encontrada em bactérias e eucariotos. Uma vez que muitos dos ACs de classe III foram identificados em eucariotos superiores e mais amplamente estudados em mamíferos, eles também são conhecidos como ACs de mamíferos. A classe IV foi identificada em *Yersinia pestis* em bactérias ruminais *Aeromonas hydrophila* ((AHUJA; KUMAR; BHATNAGAR, 2004; PASTAN; PERLMAN, 1970)DEVASANI; YAO, 2022; LINDER; SCHULTZ, 2003).

Classe V e classe VI são encontradas na bactéria anaeróbica *Prevotella ruminicola* e na bactéria fixadora de nitrogênio *Rhizobium etli*, respectivamente. As duas últimas classes de ACs ainda não foram caracterizadas estruturalmente. Os ACs de mamíferos têm dez isoformas: nove ACs transmembranares (AC1 -9) e um AC solúvel (AC10). Todos os ACs transmembrana têm uma estrutura semelhante, mas são diferentes em seu comprimento e sequência nos aminoácidos ((GALLAGHER; SMITH; KIM, 2006)(DEVASANI; YAO, 2022)).

Eles consistem em dois domínios transmembrana (M1 e M2) discretos, cada

um contendo seis alfa-hélices transmembranares, um único domínio citosólico N-terminal e dois domínios citoplasmáticos (C1 e C2). O domínio C1 fica entre dois domínios transmembranares, enquanto o domínio C2 está na região terminal da proteína. Esses domínios C1/C2 são subdivididos em subdomínios C1a/C2a e C1b/C2b. Os subdomínios C1a e C2a são o sítio catalítico e altamente conservados, que são estruturalmente idênticos para todas as 9 isoformas transmembranares, enquanto os subdomínios C1b e C2b são o sítio regulatório. Ao contrário de AC1-9, AC10 ainda não possui domínios transmembranares bem definidos (DESSAUER et al., 2017; DEVASANI; YAO, 2022).

Na literatura já está estabelecido que existem 10 isoformas de ACs em mamíferos (ACs 1-10), que são associados a algumas doenças e regulados por genes como os fosfodiesterases 4 de humanos (PDE4), que estão ligados a esquizofrenia, acidente vascular cerebral e asma (HOUSLAY, 2010). Além disso, a adenosina monofosfato cíclica (AMPc) tem se mostrado importante para a modulação de diferentes mecanismos de patogênese viral em infecções por hepatite B, hepatite C e HIV. Recentemente, esse segundo mensageiro também foi implicado na patogénia do ZIKV, sugerindo genes nesse caminho como candidatos a estudos de associação (FARQUHAR et al., 2008; MORENO-FERNANDEZ et al., 2011; ROSSI et al., 2019; ZHANG et al., 2016).

AC não é apenas um simples estimulante para produção do AMPc, mas também um importante centro de sinalização envolvido em diversos processos essenciais para a sobrevivência celular (COOPER; TABBASUM, 2014). A cascata de sinalização da AC (figura 5) é ativada em resposta a um grande número de ligantes extracelulares, a exemplo dos hormônios e dos autacóides (prostaglandinas, histamina e serotonina). Ao entrar na célula, esses agentes externos ativa o receptor de proteína G, forçando uma mudança conformacional, que por sua vez ativa as moléculas de proteína G, e dessa forma a molécula de AC produz AMPc e ATP (DIDIER, 2018; ROSSI et al., 2018). O AMPc é um componente celular importante envolvido no metabolismo energético das células, em diversas funções das células, como ativação de canais de íons, metabolismo, expressão gênica, crescimento, diferenciação e morte celular (ERRANTE et al., 2018).

Quando o SNC é invadido por agentes estranhos, como por exemplo partículas

virais, há uma estimulação para secreção de citocinas pró-inflamatórias como TNF- α e IL-1 β , que por sua vez ativam células da imunidade inata, levando a produção de outras citocinas e desencadeando um processo inflamatório local, responsável pela lesão das células neurais e muitas vezes ao processo de morte celular. A via do AMPc atua como uma cascata de sinalização na tentativa de manter a homeostase e seus níveis aumentados parece reduzir o efeito destrutivo das citocinas pró-inflamatórias na micróglia. No entanto, as citocinas pró-inflamatórias podem reduzir os níveis do AMPc através da inibição do AC (GHOSH et al., 2012b; PATRIZIO, 2004). O mRNA de ADCY9 é amplamente expresso no cérebro com altos níveis no sistema olfativo, neocórtex, córtex piriforme, hipocampo, giro denteado, tálamo, hipotálamo e cerebelo. Análises de sequenciamento de RNA em células cerebrais mostraram que esse gene foi altamente expresso em quase todos os tipos de células do SNC, incluindo neurônios, oligodendrócitos, astrócitos, microglia, células endoteliais, pericitos, células musculares lisas e fibroblastos. Além da regulação da função cognitiva e de memória, há evidências mostrando que ADCY9 modula a função imunológica. Existem evidências que o gene regula a quimiotaxia de neutrófilos e monócitos, bem como a função das células T. Os estudos GWAS descobriram que o polimorfismo ADCY9 estava associado à asma, transtornos do humor e à eficácia do dalcetrapib, uma droga antiaterogênica (Huang et al., 2009; Liu et al., 2010; Yucesoy et al., 2015; Toyota et al., 2002).

Durante o ciclo de vida de alguns vírus como hepatite B (HBV), imunodeficiência humana (HIV) e herpes simples tipo 1 (HSV-1), são reconhecidos por sensores de DNA/RNA do hospedeiro, sendo um desses sensores a via do AMP-GMP cíclico. Esta vem sendo relatada como responsável pelo reconhecimento do material genético viral e posteriormente induzir a ativação de genes ligados a produção de interferons (DANSAKO et al., 2016).

O aumento dos níveis de AMPc inicia uma via de transdução de sinal PI3K-Akt-mTOR, independente da adenilato ciclase, levando a efeitos estressores nas células (EVRIPLOTI et al., 2019). Essa via está diretamente envolvida no processo de neurogênese, o qual se inicia no ambiente intrauterino, e reflete no desenvolvimento cerebral (GÖTZ; HUTTNER, 2005). Essa via de sinalização (mTOR) é responsável pela regulação da expressão do TNF- α induzida por antígeno, durante a modulação, *in vitro*, da resposta imunológica contra o ZIKV (THARAKAN; MANYAM,

2006)(PARK et al., 2012). O Ca^{2+} intracelular também é fundamental na sinalização de diversos eventos fisiológicos e fisiopatológicos, dentre eles, a ativação de respostas imunológicas (COOPER; TABBASUM, 2014; WANG et al., 2019).

Autofagia é descrito como um processo celular essencial no combate ao vírus, durante a interação vírus-hospedeiro, funcionando como um mecanismo de defesa do hospedeiro. Estudos relatam que células progenitoras neurais de fetos humanos identificam as proteínas estruturais do ZIKV e enviam sinais de morte para que elas próprias sejam eliminadas, na tentativa de controlar a disseminação viral para outras células não infectadas. Não obstante, o ZIKV tenta escapar desse reconhecimento, principalmente através da inibição da via PI3K-Akt-mTOR pelas proteínas não estruturais NS4A e NS4B, tendo sucesso na maioria dessas tentativas, garantindo sua replicação e transmissão célula-célula (CHIRAMEL; BEST, 2018; CHRISTIAN; SONG; MING, 2019; LIANG et al., 2016; SONG et al., 2020; ZONCU et al., 2011)

Modelos avançados para avaliação de função neural e desenvolvimento cerebral foram desenvolvidos, com base na biotecnologia, para produzir células neurais humanas a partir das células tronco. Isso possibilitou que estudos bem desenhados, utilizando modelos de linhagens celulares neurais infectadas pelo ZIKV, pudessem avaliar o efeito destes na função celular (CHRISTIAN; SONG; MING, 2019).

3.12. Fatores genéticos associados a doenças

Estudos das variantes genéticas, principalmente SNPs, podem fornecer informações importantes relativas à heterogeneidade de diversas doenças. Eles são definidos como variações intraespécies, que podem ser caracterizadas por uma mutação simples na sequência genômica de uma determinada população. Estes locais de variações no genoma, que são comuns na população, representam uma maior variabilidade genética entre os indivíduos dessa população, estando relacionado as diferenças entre os fenótipos, que é muito relevante para a área da saúde, pois muitas vezes podem explicar a suscetibilidade ou a resistência a uma doença (ALBERTS, JOHNSON, LEWINS, 2017). Dessa maneira, os estudos de gene candidato podem demonstrar se as variantes genéticas em um determinado gene exercem influência na ocorrência e gravidade de uma doença específica.

Os estudos de associação do genoma tornaram-se os métodos padrões para

elucidar a base genética de traços complexos, ou seja, aquelas características originadas por uma combinação de múltiplos fatores, sendo eles genéticos e/ou ambientais. Nesse tipo de investigação são utilizados testes estatísticos para associação de uma diversidade (centenas de milhares) de SNPs com o(s) desfecho(s) de uma determinada doença (MANOLIO,2010).

Nesses estudos genéticos, modelos com gêmeos vêm sendo utilizados, sugerindo que gêmeos monozigóticos e dizigóticos são afetados pelo meio ambiente quase que da mesma forma. Sabe-se que os gêmeos monozigóticos são mais semelhantes, enquanto os gêmeos dizigóticos têm somente 50% de similaridade genética entre si. Esses estudos podem nos auxiliar no reconhecimento da presença de um fator genético no risco de um irmão gêmeo expressar a doença enquanto o outro não, e podem ressaltar ainda a relevância da participação de diversos componentes ambientais para o desfecho de determinada doença (VALLADA FILHO; SAMAIA, 2000). (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018)

Alguns estudos que descrevem bem SNPs nos genes dos receptores Toll like (TLR), genes da proteína B relacionada à cadeia 1 do complexo principal de histocompatibilidade (MICB) e no membro A da família do domínio da lectina do tipo C 5 (CLEC5A) associados a desfechos de maior gravidade para essa infecção pelo vírus da dengue (ALAGARASU et al., 2015a; KHOR et al., 2011; XAVIER-CARVALHO et al., 2017).

3.13. Fatores genéticos e o ZIKV

Uma boa evidência para o papel da genética hospedeira na SCZ foi relatada em um estudo pioneiro utilizando gêmeos brasileiros, que mostrou maior discordância de desfecho entre pares dizigóticos do que entre os pares monozigóticos, sugerindo que uma herança recessiva e multifatorial pode estar envolvida na suscetibilidade da SCZ (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018). Um fato bastante favorável para essa evidência genética em relação ao desenvolvimento da SCZ é que todos os casos de gêmeos monozigóticos analisados responderam igualmente ao vírus, enquanto os dizigóticos (seis dos sete pares) foram discordantes, onde apenas um dos irmãos foi afetado. Os resultados desse estudo foram semelhantes em todos os pares de gêmeos estudados, o que reforça a hipótese de que essa síndrome não é um evento aleatório, sendo favorecida, possivelmente, por fatores multigênicos. Logo, quando se investigar o porquê uma

das crianças desenvolveu a síndrome e a outra não, os resultados desses trabalhos com modelos de gêmeos, poderão contribuir para tentar elucidar como o vírus atravessa a placenta e se, nesse caso, há características genéticas que tornem um feto mais ou menos resistente à infecção.

Rossi et al. (2018) realizaram um estudo que relaciona a expressão dos genes adenilato ciclase 3 (ADCY3), adenilato ciclase7 (ADCY7) e adenilato ciclase 10 (ADCY10) com a infecção pelo ZIKV. Nele foi utilizada uma coorte de mulheres brasileiras infectadas pelo vírus durante algum momento da gravidez, e verificado que variações nesses genes, que são responsáveis por codificar as proteínas maternas envolvidas na via da AMPc, possuem influência no estabelecimento da SCZ em recém-nascidos, já que o AMPc está envolvido na modulação imunológica, na resposta celular a agentes estressores (a exemplo dos vírus), entre outros eventos importantes para a manutenção da homeostase. O aumento da expressão de genes que codificam as proteínas ACs, leva ao aumento da AMPc, e consequentemente à maior gravidade da SCZ por reduzir a imunidade inata na barreira placentária e aumentar a capacidade de replicação viral, no entanto, o autor destaca a necessidade de realizar mais estudos genéticos abordando como as alterações em genes maternos podem influenciar as expressões das proteínas envolvidas na patogenicidade das células neurais do feto. Eles realizaram o sequenciamento do exoma de mães das crianças nascidas com a SCZ, expostas ao ZIKV durante o período gestacional, encontrou associação de variações de SNP em mães que tiveram crianças com a SCZ, quando comparadas com aquelas mães do grupo controle, ou seja, foram igualmente expostas, mas suas crianças nasceram sem o desfecho da SCZ. Provavelmente a elevação nos níveis do AMPc, além aumentar infectividade viral, também afeta a imunidade inata placentária, o que facilita a transmissão de mãe-filho, e os genes que mais se associaram com a SCZ foram justamente aqueles que codificam a proteína adenilato ciclase, sugerindo que eles podem interferir no desfecho da infecção pelo ZIKV. Os autores concluíram que os níveis aumentados do AMPc encontrados estão associados a desfechos de maiores gravidade da SCZ, como foi descrito para alelo G (rs11676272) do gene adenilato ciclase tipo 3 (ADCY3). Em contrapartida, eles também identificaram um efeito protetor associado as variantes (QUAIS SNPS?) no gene adenilato ciclase tipo 7 (ADCY7), provavelmente pela redução dos níveis do AMPc, portanto descobrir como os mecanismos de patogenia do ZIKV podem interferir nos níveis de AMPc é

de suma importância para o controle da infecção, já que está claro que essa molécula influencia na capacidade de infecção do vírus Zika.

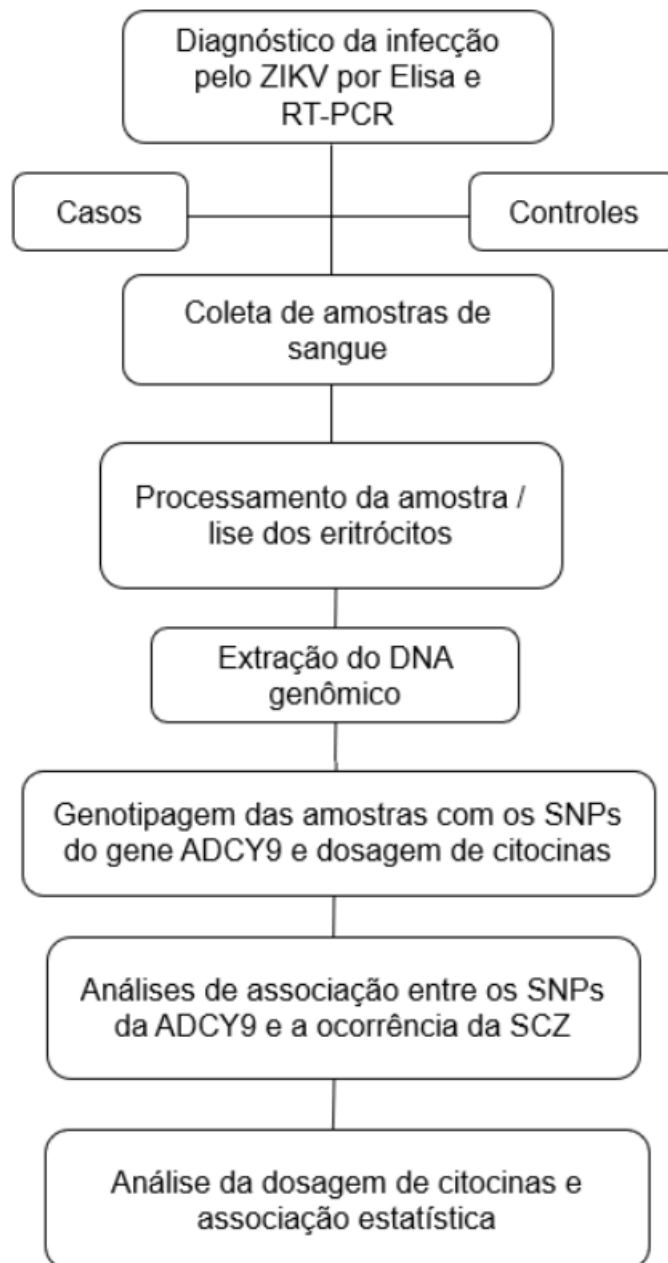
A adenilato ciclase (ADCY), que é estimulada por receptores acoplados à proteína G (como como ADRB2), catalisa a conversão de ATP em AMPc e controla a contração da musculatura lisa. O gene ADCY9 está localizado na banda 13 do braço curto do cromossomo 16 (16p13) e codifica proteína de mesmo nome (AC), estimula a produção de AMPc pelas células T reguladoras. Logo, polimorfismos especificamente nesse gene, podem estar associados ao desequilíbrio da resposta imune regulatória, desencadeando doenças imunomediadas e/ou aumento da gravidade para um determinado evento, e além disso, essas variantes podem contribuir com a variabilidade na resposta da terapia aos agonistas adrenérgicos, utilizados no tratamento da asma (BODOR et al., 2012; TEIXEIRA et al., 2017; MILLER E ORTEGA, 2013).

O SNPs rs2601796 é uma variação intragênica G>A localizado na banda 13 do braço curto do cromossomo 16 (16.p13). A frequência na população brasileira é um valor aproximado e foi calculada com base na média das frequências nas populações africana e europeia que estão disponíveis em importantes bancos de dados genéticos como 1000 GENOMES, gnomAD Genomes e Hapmap, já que essas duas populações exercem forte influência nas características da população em estudo.

O SNP rs2532019 também é um tipo de variação intragênica do tipo G>A / G>T localizada na banda 13 do braço curto do cromossomo 16. A sua frequência na população brasileira foi calculado da mesma maneira que o rs2601796.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

As metodologias aplicadas para atingir os objetivos propostos estão resumidas no desenho experimental:



4.1. Características da população

A população do estudo (Tabela 1) foi dividida em três grupos (G1-G3), e tem as seguintes características:

- Grupo caso (G1) é composto por 36 crianças com idade entre 0-4 anos, todas expostas ao vírus Zika durante desenvolvimento intrauterino e portadoras da SCZ.

Essas crianças são acompanhadas pela ONG Abraço a Microcefalia, localizada na cidade de Salvador no Estado da Bahia.

- Grupo caso (G2) é formado por 35 gestantes infectadas pelo Zika e que tiveram filhos com a SCZ.

- Grupo controle (G3) é representado 69 gestantes que tiveram resultados IgG e IgM negativos para ZIKV e seus filhos nasceram sem infecção e/ou características associadas a SCZ.

Critérios de exclusão:

- Crianças e mulheres portadoras de doenças neurológicas não relacionadas a infecção pelo ZIKV.

- Crianças e mulheres positivas para toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes e sífilis (TORCHS).

- Indivíduos com sorologia IgG positiva para Dengue vírus.

Em uma subamostra composta por 19 crianças do G1 foi realizada a dosagem de citocinas. Os indivíduos deste grupo foram divididos em portadores da síndrome congênita da Zika leve e grave de acordo com os critérios clínicos definidos pelo infectologista.

4.2. Fonte de dados

As pesquisas de artigos científicos para o embasamento teórico do projeto foram realizadas pelas bases: Portal Capes, Medline, Scielo, Pubmed, Embase. Utilizamos os seguintes descritores de busca: congenital zika syndrome, adenylate cyclase, SNPs, microcephaly, zika virus infection, cytokines, biomarkers.

4.3. Variáveis da pesquisa

Variações genéticas no ADCY9 e marcadores imunológicos e a ocorrência da Síndrome Congênita do Zika (microcefalia).

Tabela 1 - Descrição da população de estudo.

	G1 (n=36)	%	G2 (n=35)	%	G3 (n=69)	%
Idade (meses)						
Média	20.95		-		-	
Mediana	22		-		-	
Sexo						
Masculino	18	50	0	0	0	0
Feminino	18	50	35	100	69	100
Sorologia						
IgM(+)	10	27,8	0	0	69	100
IgM(-)	26	72,2	35	100		
IgG(+)	36	100	35	100	0	0
IgG(-)	0	0	0	0	69	100

G1: crianças com a SCZ; G2: gestantes ZIKV (+); G3: mulheres ZIKV (-); IgM: imunoglobulina M; IgG: imunoglobulina G.

4.4. Coleta das amostras de sangue

Uma parte das amostras foram coletadas no Laboratório de Imunologia (ICS/UFBA) localizado em Salvador (BA) e outra parte em um laboratório parceiro no município de Feira de Santana (BA), pela técnica da punção venosa, realizada por profissionais habilitados, no período de fevereiro de 2017 a dezembro de 2017. O resultado da infecção pelo vírus Zika foi confirmado por testes moleculares e/ou sorológicos. Para confirmação laboratorial da infecção pelo ZIKV, foi realizada a centrifugação das amostras, e os soros foram separados e inseridos em nossa rotina para testes moleculares para ZIKV.

4.5. Extração de DNA

A etapa de extração de DNA do sangue total foi realizada seguindo o protocolo otimizado Flexigene® Blood Kit (QIAGEN). Utilizando 100-300 µL de amostras de sangue, homogeneizando no vortex, e realizando o processo de lavagem (no mínimo 3 vezes) com o tampão de lise, centrifuga-se a amostra até que se observe a formação de um pellet transparente no fundo do eppendorf. Adiciona-se a tampão e protease na etapa posterior, homogeneizando até a dissolução do pellet formado anteriormente e leva-se ao aquecimento em banho maria por 15 minutos a 65°C. Após o aquecimento, foi realizada a etapa de precipitação do DNA foi utilizado Isopropanol 100% ou etanol PA gelado, podendo-se observar a formação do novelo (quanto mais novelo, maior o rendimento). Centrifuga-se, descarta-se o sobrenadante, e aguardar até total secagem do precipitado. Em uma última etapa, utiliza-se cerca de 100 a 300 µL de tampão de eluição e vortexar para dissolução do pellet, o material já está pronto para ser armazenado a -20°C.

Ao final da extração, as concentrações e purezas dos ácidos nucleicos foram quantificadas utilizando-se a técnica de espectrofotometria com o aparelho “NanoDrop™ Lite Spectrophotometer” (Thermo Scientific™). Uma vez que as concentrações de DNA já são conhecidas, padroniza-se essas amostras em uma concentração de 5ng/µL em um volume que variou de 100 a 200 µL utilizando água livre de nuclease em placa de biologia molecular de 96 poços (baixa ligação) e armazenadas em freezer de -20°C para serem utilizadas na próxima etapa.

4.6. Seleção dos SNPs

Após buscas em plataformas online (PubMed, Science direct, Google acadêmico) por artigos de associação genética de SNPs no gene ADCY com a SCZ com as seguintes palavras-chave: “variants” ou “Polymorphisms” ou “SNP” AND ADCY9 and SCZ ou ZIKV, porém foi encontrado apenas um artigo sobre o tema. Em seguida, foi realizada uma busca com o nome do gene em humanos (ADCY9) na plataforma Ensembl (<https://www.ensembl.org/index.html>), adotando a frequência de menor alelo (MAF) dos SNPs de 0.05 a 0.5, anotando-se informações das frequências europeia, africana e brasileira, significância clínica, função e citações. A seleção do SNP para genotipagem baseou-se em seu MAF, sua função biológica, e suas associações prévias com condições clínicas que se relacionassem com a expressão

gênica de *ADCY*, doenças inflamatórias, virais e cardiopatias. Os SNPs rs2601796 e rs2532019 foram selecionados para a genotipagem.

4.7. Genotipagem das Amostras

O ensaio de genotipagem das amostras de DNA foi realizado com o kit GoTaq Probe qPCR Master Mix (PROMEGA), pela técnica de hidrólise utilizando sondas *TaqMan® SNP Genotyping Assays* (Thermo Scientific™) no equipamento QuantStudio 12K Real-Time PCR® (Applied Biosystems).

Para iniciar o processo, é necessário descongelar a placa de 96 poços de baixa ligação e livre de DNase contendo as amostras de DNA com concentração de 5 ng/μL e a sonda do polimorfismo escolhido. Centrifugar as amostras a 1.500 rpm (20°C) por 2 minutos. O protocolo do kit foi adaptado para reações de 5μL por poço:

- As amostras foram pipetadas em placas de PCR de 384 poços;
- Foram adicionados 2 μL de DNA e 3 μL de mistura reacional (Master mix, água DPEC e sonda do SNP) a cada poço.

4.8. Análise *in silico*

Para obtenção de dados sobre a função dos SNPs foram realizadas consultas no National Center for Biotechnology Information (NCBI), acessado pelo site (www.ncbi.nlm.nih.gov).

RegulomeDB (regulomedb.org) é um banco de dados que inclui dados experimentais de alto rendimento do ENCODE e de outras fontes, bem como previsões computacionais e anotações manuais para identificar potenciais reguladores putativos e identificar variantes funcionais.

auxilia na interpretação de variantes regulatórias no genoma humano. Esse banco é composto de dados experimentais de alto rendimento da ENCODE (Enciclopédia de Elementos de DNA) e outras fontes, que identifica potenciais regiões reguladoras e variantes funcionais dos genes por meio de previsões computacionais e anotações manuais. Através de pontuações 1 (a,b,c,d,e,f); 2 (a,b,c); 3 (a,b); 4; 5 e 6, que indicam o grau de evidencia funcional de uma variante. As pontuações mais baixas indicam evidências que as variantes estão localizadas em uma região funcional, enquanto as pontuações mais altas apontam o inverso. Ou seja, pontuações de 1a a 1f indicam que a variante provavelmente afetará a ligação e está ligada à expressão de um gene alvo, enquanto as pontuações de 2a a 2c indicam apenas

que a variante provavelmente afetará a ligação. Aquelas com pontuações de 3a e b são menos propensas a afetar a ligação, e pontuações de 4, 5 e 6 indicam evidência mínima de ligação ou nenhum dado disponível auxilia na interpretação da expressão gênica (BOYLE et al., 2012).

O Genotype-Tissue Expression Project GTEx (www.gtexportal.org) criado pelo National Institutes of Health Common Fund fornece um banco de dados da variação genética e a expressão gênica em vários tecidos de referência em humanos. O *mapeamento de locais* de traços quantitativos de expressão (eQTL) oferece uma abordagem poderosa para elucidar o componente genético subjacente à expressão gênica alterada. A variação genética também pode influenciar a expressão gênica por meio de alterações no splicing, RNAs não codificantes e estabilidade do RNA. A expressão gênica é regulada de maneira diferenciada em cada tecido, e muitos transcritos humanos são expressos em um conjunto limitado de tipos de células ou durante um estágio de desenvolvimento limitado (The GTEx Consortium, 2014). Desse projeto foram retiradas informações sobre o impacto funcional dos SNPs 2601796 e 2532019 em amostras de sangue.

4.9. Dosagem de citocinas

Foram testadas 19 amostras de plasma para dosagem das citocinas Eotaxina, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-10, IL-12p40, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1RA, IL-1 α , IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-5, IL-6 e TNF utilizando o kit MILLIPEX® (Merck, Darmstadt, Alemanha) e seguindo as instruções do fabricante. O teste foi realizado utilizando o sistema Luminex MAGPIX® (Life Technology, EUA) baseado na medição de sinais fluorescentes liberados por uma suspensão de microesferas de anticorpos específicos para citocinas em placas de 96 poços. Uma curva padrão de oito pontos foi usada para cada citocina. Os dados foram analisados utilizando o software Analyst 5.1 MILLIPEX® (Merck, Darmstadt, Alemanha).

4.10. Análise estatística

O controle de qualidade para todos os SNPs foi realizado em etapas usando o PLINK versão 1.07 usando os seguintes parâmetros: desvio do equilíbrio de Hardy-Weinberg (HWE) com valor P menor que 10^{-3} , frequência do alelo menor (MAF) menor que 5 % e porcentagem de *loci* ausentes superior a 1%, e as associações genéticas foram realizadas usando PLINK 1.07 (Purcell et al., 2007). A regressão logística multivariada para os SNPs foram realizadas utilizando os modelos aditivo e dominante. Observou-se o valor P assintótico e estimou-se o odds ratio (OR).

O programa comercial SPSS (versão 20.0, SPSS Inc., Chicago, IL) foi utilizado para análise da dosagem de citocinas. A normalidade da distribuição dos dados foi avaliada pelo teste de Kolmogorov-Smirnov. O teste não paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado para comparar os dados entre os grupos. Para indicar quais citocinas são mais significativas em relação ao desfecho, realizamos a análise da curva ROC que leva em conta sensibilidade e especificidade, e por trás disso tem uma certa ideia de diagnóstico no meio. Portanto, variáveis com AUC alta (e significativa) seriam bons preditores para SCZV. Os resultados foram analisados e comparados, levando-se em consideração o nível de significância $p < 0,05$.

4.11. Aspectos éticos

Durante o ano de 2017 os termos de consentimento livre e informado (TCLE) foram obtidos dos adultos e a permissão dos pais foi obtida para as crianças. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética do Hospital Couto Maia (45483115.9.000.0046).

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Na tabela 2 estão informações sobre cromossomo e posição cromossômica, identificação, alelo referência, frequência do menor alelo (MAF), função e pontuação no RegulomeDB dos dois SNPs discutidos no presente estudo.

Tabela 2 - Descrição dos SNPs no gene ADCY9. Da esquerda para a direita: cromossomo, ID do SNP, posição, genótipo, MAF, função e escore no Regulome Db.

CHR	SNP	Posição	Alelos	MAF	Função ^b	Score Regulome DB
16	rs2601796	4037975	G/A	0.46	intron variant	7
16	rs2532019	4074299	G/A/T	0.48	intron variant	5

Alelos: selvagem/polimórfico (NCBI); CHR: Cromossomo; MAF: Frequência do menor alelo.

Do nosso conhecimento, este é o primeiro trabalho a examinar a associação genética entre variantes do gene *ADCY9* com SCZ. Nossos dados indicam que os polimorfismos *ADCY9* rs2601796 e rs2532019 não foram associados com o aumento da gravidade em crianças com a síndrome congênita do ZIKA. Quando comparamos os valores de MAF da nossa população de estudo com outras populações, observamos que apresentam os valores de frequência são próximos o que sugere que este polimorfismo não influencia na ocorrência da síndrome congênita (Tabela 3).

O SNPs rs2601796 (OR 0.91) apresenta OR < 1, associado a proteção ao desfecho em estudo, porém que não podem ser considerados significativos, pois todos apresentaram valores de $p > 0.05$. Esse resultado ocorreu provavelmente pelo reduzido tamanho do N amostral, no grupo das gestantes positivas para ZIKV que deram a luz a crianças com microcefalia (Tabela 4).

Tabela 3 - Frequência do rs2601796 na população europeia, africana e em diferentes coortes na população brasileira para o alelo polimórfico (A).

População	MAF (rs2601796)	MAF (rs2532019)
Europeia	0.78	0.73
Africana	0.31	0.34
ABRAÇO	0.41	0.43
PROAR	0.48	0.49
ARBOVIROSES	0.42	0.43
SCAALA	0.46	0.48

MAF: frequência do menor alelo; PROAR: Programa Controle de Asma e Rinite na Bahia; SCAALA: Projeto Social Changes Asthma and Allergy in Latin America; ARBOVIROSES: Projeto coordenado pela profa. Dra. Glória Teixeira sobre arboviroses em Feira de Santana, Bahia.

O rs2532019 foi desconsiderado para as análises por ter apresentado uma contaminação na sonda, e devido a falta de tempo hábil para o processo de compra / análise em bancada, dificultado pelo período pandêmico em que nos encontramos, resolvemos prosseguir com apenas um SNP (rs2601796)

Apesar das fortes evidências da transmissão vertical do ZIKV, os mecanismos pelos quais o ZIKV prejudica o desenvolvimento fetal ainda não estão totalmente elucidados. A rápida evolução do vírus e a busca de mutações patogênicas têm sido o foco de muitos estudos, embora nenhuma mutação viral específica responsável por casos graves tenha sido descrita. Além disso, mesmo em regiões onde mais cepas patogênicas estão presentes, a maioria dos casos não resulta em malformações fetais, indicando que fatores de risco adicionais, como genética do hospedeiro e o ambiente, podem estar envolvidos no desfecho da Síndrome Congênita (NGUYEN et al., 2017; TABATA et al., 2016; WANG et al., 2017).

Tabela 4- Associações de regressão logística entre a variante rs2601796 do ADCY9 pelos modelos aditivo, dominante e recessivo das mães ZIKK (+) e mães ZIKV (-).

SNP	Modelo	GENO	Gestantes ZIKV (+) n (%)	Gestantes ZIKV (-) n (%)	OR	95% CI	Valor p	Valor p perm
ADCY9 X Filhos com SCZ								
rs2601796	ADD	AA	5 (26.32%)	14 (20.29%)	0.91	0.46-1.80	0.79	0.64
		GA	5 (26.32%)	30 (43.48%)				
		GG	9 (47.37%)	25 (36.23%)				
	DOM	GA + AA	10 (52.63%)	44 (63.77%)	0.63	0.23-1.76	0.38	0.35
		GG	9 (47.37%)	25 (36.23%)				
	REC	GA + AA	5 (26.32%)	14 (20.29%)	1.40	0.43-4.55	0.57	0.86
		AA	14 (73.68%)	55 (79.71%)				

SNP: Polimorfismo de nucleotídeo único; GENO: Genótipo; ZIKV: Zika vírus; OR: Razão de chances; 95% CI: Intervalo de confiança; Valor p perm: Valor do p permutacional; ADCY9: gene adenilato ciclase 9; SCZ: Síndrome Congênita do Zika vírus.

A primeira evidência do papel da genética do hospedeiro na CZS foi relatada em um estudo utilizando gêmeos brasileiros, que mostrou maior discordância de resultados entre pares dizigóticos do que entre gêmeos monozigóticos e sugeriu que uma herança recessiva e multifatorial pode estar envolvida na suscetibilidade à

CZS. Nele foi demonstrado que o AMPc está envolvido na modulação de diferentes mecanismos da patogênese viral nas infecções por hepatite B, hepatite C e HIV. Esse segundo mensageiro vem sendo descrito como importante papel na neuropatogênese do ZIKV, sugerindo genes nesta via possam ser usados como candidatos para estudos de associação (CAIRES-JÚNIOR et al., 2018; MORENO-FERNANDEZ et al., 2011; ZHANG et al., 2016).

O estudo de Rossi et al. (2019) com três genes que codificam adenilato ciclase (*ADCY3*, *ADCY7* e *ADCY10*) foram associados à CZS. A associação desses genes com a suscetibilidade à CZS foi confirmada após análise baseada em genes, e os resultados para *ADCY3* e *ADCY7* permaneceram estatisticamente significativos após o ajuste de Bonferroni para comparações múltiplas. Além disso, análises *in silico* mostraram que a variação de c.1297G>A tinha um alto potencial para danificar a estrutura e/ou função da proteína *ADCY7*. Embora rs11676272 tenha sido considerado benigno pelos algoritmos, essa variação já foi relatada como um locus de traço quantitativo de expressão (eQTL) para o gene *ADCY3*, com o alelo G associado a níveis mais elevados de transcrição em amostras de sangue total. Por fim, esses dados mostram que a variação genética em genes relacionados ao AMPc em mulheres grávidas desta coorte influencia o risco de CZS em seus bebês e confirma o papel da via do adenilato/AMPc na replicação, transmissão viral e/ou patogênese do ZIKV.

Usando a plataforma GTEx encontramos rs2532019 ($p < 0,001$) e rs2601796 ($p < 0,001$) associados a expressão diferencial de *ADCY9* no sangue total (Fig. 5) (The GTEx Consortium, 2014). Embora a plataforma GTEx indique que estas variáveis afetam a expressão da Adenilato ciclase 9, não foi encontrada associação entre elas e a SCZ. Contudo, nosso N amostral é pequeno e mais investigações devem ser realizadas para confirmar nossos achados.

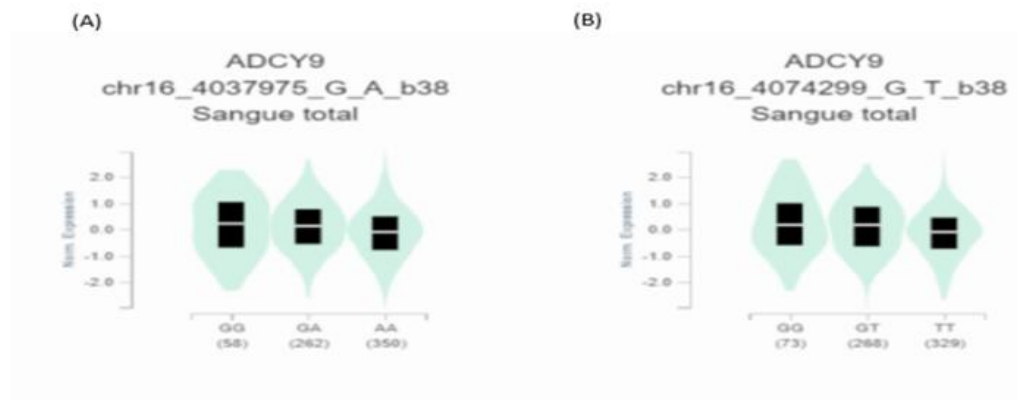


Figura 5: Nível de expressão do ADCY9 (GTEX) agrupados por genótipos de (A) rs2601796 e (B) rs2532019 usando amostras de sangue total ($p < 0,001$).

Sabe-se que citocinas são proteínas sinalizadoras presentes numa quantidade significativa, secretadas pelas células imunes, que estão envolvidas em praticamente todas as vias da imunidade e inflamação, incluindo imunidade inata, apresentação de antígenos, diferenciação da medula óssea, recrutamento e ativação celular e expressão de moléculas de adesão (BORISH; STEINKE, 2003). Algumas delas desempenham um papel na sinalização no sistema nervoso central (SNC) podendo atuar na regulação do sono, na geração e recuperação da memória de longo prazo, no foco da atenção, bem como em doenças neurodegenerativas e na integridade da barreira hematoencefálica (HOFER; PHARMACOLOGY; 2016, 2015; WALSH et al., [s.d.]).

Baseado nisso foi realizada a dosagem de um painel de citocinas para comparar os níveis de citocinas inflamatórias no grupo de crianças com síndrome leve e no grupo das que apresentaram a síndrome grave. A técnica de ensaio Multiplex foi utilizada seguindo protocolo estabelecido pelo fabricante e as médias dos seus resultados obtidos foram analisadas por testes não paramétricos, já que esses valores não obedeceram a curva normal. De todas as citocinas desse painel (Eotaxina, GM-CSF, IFN- α , IFN- γ , IL-12p40, IL-13IL1RA, IL-1 α , IL-1b, IL-17A, IL-5, TNF e IL-4), apenas os níveis de IL-2, IL-6 e IL-15 se encontravam aumentados apresentando valores de p significativos ($p < 0,002$, $p < 0,003$ e $p < 0,003$, respectivamente) em crianças com Síndrome Congênita grave. Para uma melhor acurácia dos nossos resultados, foi realizada uma curva ROC, que confirmou esse aumento da liberação de citocinas IL-2, IL-6 e IL-15 com os quadros de maior gravidade da síndrome nas crianças.

Em condições fisiológicas, baixos níveis de IL-6 estão presentes no cérebro. Um aumento na expressão e secreção de IL-6 é observado durante vários distúrbios neurológicos, incluindo Alzheimer e doença de Parkinson (BENVENISTE, 1998), câncer cerebral (LILJA et al., 2001), esclerose múltipla (MAIMONE; GUAZZI; ANNUNZIATA, 1997) e isquemia cerebral (ALL et al., 2000). A falta de sinalização de IL-6 desempenha um papel crítico tanto na inflamação quanto na neuroproteção, demonstrada pela diminuição da ativação glial em camundongos com níveis de IL-6 reduzidos em resposta à lesão traumática do SNC (PENKOWA et al., 1999). No entanto, a IL-6 também promove a diferenciação de oligodendrócitos (GRUOL; NELSON, 1997), atua como fator neurotrófico (AKANEYA; TAKAHASHI; HATANAKA, 1995) e é importante na regeneração de nervos periféricos. Como a IL-6 desempenha um papel central na função fisiológica neuronal e glial, bem como nas vias neuroinflamatórias observadas comumente em doenças do SNC, ela é de suma importância em uma diversidade de patologia e sua atuação precisa ser melhor explorada na no fenótipo de gravidade da Síndrome congênita (ROTHAUG; BECKER-PAULY; ROSE-JOHN, 2016).

Em nossos resultados tanto a IL-2 quanto a IL-15 apresentaram maiores níveis na síndrome grave, e segundo Carson et al.(1994) a IL-2 produzida pelas células T ativadas pode aumentar as respostas das células NK a infecções. As células NK dependem de IL-15 para desenvolvimento, iniciação e resposta citotóxica. O papel da IL-2 no aumento da atividade citolítica das células NK pode ser explicado pela ativação seletiva da IL-2 de JAK2 e STAT4 em células NK humanas. tanto a IL-2 quanto a IL-15 desempenham importante papel para a geração e persistência das células NK, portanto se tornam críticas para a sobrevivência das células NK.

Alguns estudos associaram o comprometimento total ou parcial do número e função das células NK, com maior suscetibilidade a infecções virais, incluindo vírus herpes simplex (HSV), vírus varicela zoster, citomegalovírus (CMV) e vírus do papiloma humano. Esses estudos estabeleceram o papel crítico das células NK funcionais no controle de infecções virais em humanos. As citocinas regulam a ontogenia, sobrevivência e proliferação, ativação/maturação e citotoxicidade das células NK, sendo IL-2 e IL-15 os principais mediadores desta regulação. As células NK podem ser ativadas diretamente pelo vírus, reconhecendo padrões virais via TLR

ou indiretamente através de citocinas como IL-2. A IL-15 é uma citocina com estrutura e função semelhantes à IL-2, portanto, ambas são essenciais para o desenvolvimento, expansão e sobrevivência das células NK e T. Além disso, a IL-15 aumenta a citotoxicidade das células NK (COLAVITA; BORDONI; CAGLIOTI, 2018; JOST; IMMUNOL; 2013, [s.d.]).

6. CONCLUSÃO

Os polimorfismos no gene ADCY9 estudados neste trabalho parecem não desempenhar um papel na gravidade da SCZ. Este estudo tem uma limitação no número de amostras, por isso, investigações adicionais sobre o papel de ADCY-9, IL-2, IL-6 e IL-15, bem como outros potenciais genes da via do adenilato e citocinas imunomoduladoras, podem ajudar como esses fatores contribuem para a imunopatologia associada à SCZ. Portanto, é válido realizar mais estudos em outras populações, com um melhor poder estatístico, para confirmar se variantes no gene ADCY9 e as citocinas IL-2, IL-6 e IL-15 interferem na resposta imune implicando na gravidade da Síndrome Congênita.

REFERÊNCIAS

AHUJA, N.; KUMAR, P.; BHATNAGAR, R. The adenylate cyclase toxins. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 187–196, 2004.

AKANEYA, Y.; TAKAHASHI, M.; HATANAKA, H. Interleukin-1 β Enhances Survival and Interleukin-6 Protects against MPP⁺ Neurotoxicity in Cultures of Fetal Rat Dopaminergic Neurons. **Experimental Neurology**, v. 136, n. 1, p. 44–52, 1 nov. 1995.

ALAGARASU, K. et al. Polymorphisms in RNA sensing toll like receptor genes and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 220, n. 1, p. 164–168, 1 jan. 2015a.

ALAGARASU, K. et al. Association of FCGR2A p.R131H and CCL2 c.-2518 A > G gene variants with thrombocytopenia in patients with dengue virus infection. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 819–822, 1 nov. 2015b.

ALIJOTAS-REIG, J. et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 40–53, 1 ago. 2017.

ALL, C. et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 20, n. 6, p. 956–966, 2000.

ANAYA, J. M. et al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia. **Journal of autoimmunity**, v. 77, p. 123–138, 1 fev. 2017.

BARROS, J. B. DE S. et al. Acute Zika virus infection in an endemic area shows modest proinflammatory systemic immunoactivation and cytokine-symptom associations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.

BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 4 nov. 2017.

BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 11 maio 2016.

BENVENISTE, E. N. Cytokine actions in the central nervous system. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 9, n. 3–4, p. 259–275, 1 dez. 1998.

BJÖRKANDER, S. et al. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 59, n. 2, p. 392–399, 2012.

BJÖRKANDER, S.; BREMME, K.; PERSSON, J. Marcadores inflamatórios associados à gravidez estão elevados em mulheres grávidas com lúpus eritematoso sistêmico. **Cytokine**, 2012.

BLACKMORE, E. et al. Psychiatric symptoms and proinflammatory cytokines in

pregnancy. **Psychosomatic Medicine**, v. 73, n. 8, p. 656–663, 2011.

BORDA, V. et al. Whole-exome sequencing reveals insights into genetic susceptibility to Congenital Zika Syndrome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009507, 1 jun. 2021a.

BORDA, V. et al. Whole-exome sequencing reveals insights into genetic susceptibility to Congenital Zika Syndrome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009507, 14 jun. 2021b.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460–S475, 2003.

BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 1 set. 2012.

BRANT, S. R. et al. Genome-Wide Association Study Identifies African-Specific Susceptibility Loci in African Americans With Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 1, p. 206- 217.e2, 1 jan. 2017.

BRASIL. Resumo executivo Saúde Brasil 2015/2016: uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti. 2015a.

BRASIL. **Ministério da Saúde Secretaria Atenção à Saúde PROTOCOLO DE ATENÇÃO À SAÚDE E RESPOSTA À OCORRÊNCIA DE MICROCEFALIA RELACIONADA À INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov.br>. Acesso em: 3 jul. 2021b.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

CAMACHO-ZAVALA, E. et al. Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with CXCL10 Increase. **Viruses**, v. 13, n. 1, 2021.

CAMPOS, G. S. et al. New Challenge for Zika Virus Infection: Human Reservoirs? **Viral Immunology**, v. 33, n. 6, p. 489–492, 1 jul. 2020.

CARSON, W. E. et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1395–1403, 1 out. 1994.

CESARIS, P. DE et al. O fator de necrose tumoral- α induz a produção de interleucina-6 e a expressão do ligante de integrina por vias de transdução distintas. **Journal of Biological**, 1998.

CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1–13, 1 abr. 2016.

CHEN, J. et al. Outcomes of Congenital Zika Disease Depend on Timing of Infection and Maternal-Fetal Interferon Action. **Cell Reports**, v. 21, n. 6, p. 1588–1599, 7 nov. 2017.

CHIRAMEL, A. I.; BEST, S. M. **Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis***Virus Research*Elsevier B.V., , 2 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28899653/>>. Acesso em: 1 jul. 2021

CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. L. Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 42, p. 249–269, 2019.

CIPRIANO, R.; MONTEIRO, C. C. A report about Zika virus in Brazil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 1, p. 37–40, 4 jan. 2016.

CLOËTTA, D. et al. Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 18, p. 7799–7810, 2013.

COLAVITA, F.; BORDONI, V.; CAGLIOTI, C. ZIKV infection induces an inflammatory response but fails to activate types I, II, and III IFN response in human PBMC. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

COOPER, D. M. F.; TABBASUM, V. G. **Adenylate cyclase-centred microdomains***Biochemical Journal*Portland Press Ltd, , 1 set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25102028/>>. Acesso em: 1 jul. 2021

COSTA, E. I. F. S. et al. Níveis plasmáticos do TNF-alfa em gestantes com infecção pelo Zika vírus (ZIKV) e sua relação com gravidade da síndrome congênita: revisão sistemática e metanálise. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e428101019080–e428101019080, 2021.

DA SILVA, E. et al. **ZIKA VÍRUS: FATORES EVOLUTIVOS DETERMINANTES PARA SUA EPIDEMIA E PATOGENIA***REVISTA SAÚDE INTEGRADA*. [s.l: s.n.]. Disponível em: <<http://local.cneccsan.edu.br/revista/index.php/saude/index>>. Acesso em: 9 jul. 2021.

DA SILVA, M. H. M. et al. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 208, n. 6, 2019.

DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 4 ago. 2016.

DANSAKO, H. et al. The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly. **FEBS Journal**, v. 283, n. 1, p. 144–156, 1 jan. 2016.

DE OLIVEIRA, C. S.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 2, p. 103–105, 1 mar. 2016.

DELGADO, M.; LECETA, J.; GANEA, D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 1, p. 155–

164, 1 jan. 2003.

DESSAUER, C. W. et al. International union of basic and clinical pharmacology. Cl. Structures and small molecule modulators of mammalian adenylyl cyclases. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 96–139, 2017.

DEVASANI, K.; YAO, Y. Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 1 dez. 2022.

DICK, G. W. A. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.

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

DIDIER, S. Adenylate Cyclases of Trypanosoma brucei, Environmental Sensors and Controllers of Host Innate Immune Response. **Pathogens**, v. 7, n. 2, 1 jun. 2018.

DUARTE, G. et al. **Infecção do vírus Zika em gestantes e microcefalia** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia* Federação Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia, , 2 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575919/>>. Acesso em: 4 jul. 2021

ERRANTE, P. et al. SINALIZAÇÃO MEDIADA PELOS NUCLEOTÍDEOS ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (AMPC) E GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPC) NO CÂNCER. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 15, n. 39, p. 131–141, 31 ago. 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome**. [s.l: s.n.].

EVRIPIOTI, A. A. et al. Phosphodiesterase-induced cAMP degradation restricts hepatitis B virus infection. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1773, 2019.

FAIZAN, M. I. et al. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. **Intervirology**, v. 59, n. 3, p. 152–158, 1 fev. 2016.

FARQUHAR, M. J. et al. Protein Kinase A-Dependent Step(s) in Hepatitis C Virus Entry and Infectivity. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8797–8811, set. 2008.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 18 fev. 2016.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FRANÇA, G. V. A. DE et al. 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 : revista do Sistema Único de Saúde do Brasil**, v. 27, n. 2, p. e2017473, 2 jul. 2018.

- GALLAGHER, D.; SMITH, N.; KIM, S. Structure of the class IV adenylyl cyclase reveals a novel fold. **Journal of molecular biology**, v. 362, n. 1, p. 114–122, 2006.
- GARCIA, L. P. Epidemia do Vírus Zika e Microcefalia no Brasil: Emergência, Evolução e Enfrentamento equipe. 2018.
- GARLANDA, C. et al. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003–1018, 2013.
- GHOSH, M. et al. Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. **GLIA**, v. 60, n. 12, p. 1839–1859, dez. 2012a.
- GHOSH, M. et al. Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. **GLIA**, v. 60, n. 12, p. 1839–1859, dez. 2012b.
- GHOZZI, V. E. et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. **Cell death & disease**, v. 8, n. 1, 2017.
- GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. **The cell biology of neurogenesis** *Nature Reviews Molecular Cell Biology* Nature Publishing Group, , nov. 2005. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm1739>>. Acesso em: 2 jul. 2021
- GRUOL, D. L.; NELSON, T. E. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. **Molecular neurobiology**, v. 15, n. 3, p. 307–339, 1997.
- HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.
- HEUKELBACH, J. et al. Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 2, p. 116–120, 1 fev. 2016.
- HIGUCHI, T. et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. **Tissue Antigens**, v. 51, n. 6, p. 605–612, 1 jun. 1998.
- HOFER, M.; PHARMACOLOGY, I. C.-B. JOURNAL OF; 2016, UNDEFINED. Immunoinflammatory diseases of the central nervous system—the tale of two cytokines. **Wiley Online Library**, v. 173, n. 4, p. 716–728, 1 fev. 2015.
- HOLTAN, S. et al. Growth modeling of the maternal cytokine milieu throughout normal pregnancy: macrophage-derived chemokine decreases as inflammation. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 11, 2015.
- JOST, S.; IMMUNOL, M. A.-A. R.; 2013, UNDEFINED. Control of human viral infections by natural killer cells. **academia.edu**, [s.d.].
- KAM, Y. W. et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, 2017.
- KASZTELEWICZ, B. et al. Cytokine gene polymorphism associations with congenital

cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. **European Journal of Clinical Microbiology & Infectious Diseases** 2017 **36:10**, v. 36, n. 10, p. 1811–1818, 13 maio 2017.

KEASEY, S. et al. Antibody Responses to Zika Virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 24, n. 4, 1 abr. 2017.

KERUI, V. et al. Lipopolysaccharide-Induced Dephosphorylation of AMPK-Activated Protein Kinase Potentiates Inflammatory Injury via Repression of ULK1-Dependent Autophagy. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. JUN, 25 jun. 2018.

KHOR, C. C. et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. **Nature Genetics** 2011 **43:11**, v. 43, n. 11, p. 1139–1141, 16 out. 2011.

KINDBERG, E. et al. A Functional Toll-Like Receptor 3 Gene (TLR3) May Be a Risk Factor for Tick-borne Encephalitis Virus (TBEV) Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 4, p. 523–528, 15 fev. 2011.

KUMAR, A.; GIRI, S.; KUMAR, A. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside-mediated adenosine monophosphate-activated protein kinase activation induces protective innate responses in bacterial endophthalmitis. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1815–1830, 1 dez. 2016a.

KUMAR, A.; GIRI, S.; KUMAR, A. AICAR-mediated AMPK activation induces protective innate responses in bacterial endophthalmitis. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1815, 1 dez. 2016b.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 3 abr. 2007.

LAERTE PINTO JUNIOR, V. et al. **Vírus Zika: Revisão para Clínicos Zika Virus: A Review to Clinicians**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.actamedicaportuguesa.com>. Acesso em: 3 jul. 2021.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 3 nov. 2016.

LILJA, A. et al. Expression of the IL-6 family cytokines in human brain tumors. **International journal of oncology**, v. 19, n. 3, p. 495–499, 2001.

LOPEZ-CASTEJON, G.; REVIEWS, D. B.-C. & GROWTH FACTOR; 2011, U. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011.

LUM, F. M. et al. Immunological observations and transcriptomic analysis of trimester-specific full-term placentas from three Zika virus-infected women. **Clinical and Translational Immunology**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2019.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, 2004.

MACIEL, I. J.; JÚNIOR, J. B. S.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 30 out. 2008.

MAIMONE, D.; GUAZZI, G. C.; ANNUNZIATA, P. IL-6 detection in multiple sclerosis brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 146, n. 1, p. 59–65, 27 fev. 1997.

MANOLIO, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 2, p. 166–176, 8 jul. 2010.

MING, G. LI; SONG, H. **Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions**NeuronNeuron, , 26 maio 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21609825/>>. Acesso em: 4 jul. 2021

MIRANDA-FILHO, D. B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **American journal of public health**, v. 106, n. 4, p. 598–600, 1 abr. 2016.

MOREIRA, D. et al. AMP-activated Protein Kinase As a Target For Pathogens: Friends Or Foes? **Current drug targets**, v. 17, n. 8, p. 942–953, 10 maio 2016.

MORELLI, S. S. et al. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. **Research and Reports in Biology**, v. 6, p. 171–189, 2015.

MORENO-FERNANDEZ, M. E. et al. Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP-dependent mechanism. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5372–5380, 19 maio 2011.

MOSIMANN, B. et al. Maternal serum cytokines at 30–33 weeks in the prediction of preeclampsia. **Wiley Online Library**, v. 33, n. 9, p. 823–830, set. 2013.

MUSSO, D. et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359, 2015.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. **Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya?**The LancetLancet Publishing Group, , 18 jul. 2015. Disponível em: <<http://ees.elsevier.com/thelancet/www.thelancet.com>>. Acesso em: 25 jun. 2021

NAVECA, F. G. et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, 2018.

NAYAK, T. K. et al. Regulation of Viral Replication, Apoptosis and Pro-Inflammatory Responses by 17-AAG during Chikungunya Virus Infection in Macrophages. **Viruses**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2017.

NEM DE OLIVEIRA SOUZA, I. et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. **Science translational medicine**, v. 10, n. 444, jun. 2018.

NGUYEN, S. M. et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, 1 maio 2017.

NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, 11 ago. 2016.

NUNES, M. L. et al. **Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil** *Jornal de Pediatria* Elsevier Editora Ltda, , 1 maio 2016.

OJHA, C. R. et al. **Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 15 out. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 25 jun. 2021

OKAMOTO, T. et al. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. **Viruses** **2017, Vol. 9, Page 243**, v. 9, n. 9, p. 243, 28 ago. 2017.

PARK, J. W. et al. Destabilization of TNF- α mRNA by rapamycin. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 43–49, jan. 2012.

PASTAN, I.; PERLMAN, R. Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. **Science**, v. 169, n. 3943, p. 339–344, 1970.

PATRIZIO, M. Tumor necrosis factor reduces cAMP production in rat microglia. **GLIA**, v. 48, n. 3, p. 241–249, 15 nov. 2004.

PENKOWA, M. et al. **Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice**. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990215\)25:4%3C343::AID-GLIA4%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-1136(19990215)25:4%3C343::AID-GLIA4%3E3.0.CO;2-V)>. Acesso em: 20 set. 2022.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PETRÔNIO, C. N. V. et al. O Início da Epidemia do Zika Vírus e os seus Reflexos na Saúde Pública Nacional e Internacional. **Id on Line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 12, n. 40, p. 1232–1235, 3 jun. 2018.

PINHEIRO, Y. G. A. et al. **EVENTOS MOLECULARES E FISIOPATOLOGIA DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS**. Disponível em: <<https://revista.iesgo.edu.br/ojs/index.php/CSEI/article/view/23/11>>. Acesso em: 3 jul. 2021.

POLAND, G. A. et al. Development of vaccines against Zika virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. e211–e219, 1 jul. 2018.

RABELO, K. et al. Placental Inflammation and Fetal Injury in a Rare Zika Case Associated With Guillain-Barré Syndrome and Abortion. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. MAY, 16 maio 2018.

RABELO, K. et al. Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 11, 1 set. 2020.

REBOREDO, L. et al. Zika Virus Congenital Syndrome and MTOR gene variants: insights from a family of dizygotic twins. **Heliyon**, v. 7, n. 4, 1 abr. 2021.

REIJNDERS, I. F.; GMGJ MULDER, A.; KOSTER, M. P. Desenvolvimento e função placentária em mulheres com histórico de complicações relacionadas à placenta: uma revisão sistemática. **Acta Obstetricia et**, v. 97, n. 3, p. 248–257, 1 mar. 2018.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; ESPINOZA-FLORES, L. A. Should we be worried about sexual transmission of Zika and other arboviruses? **International maritime health**, v. 68, n. 1, p. 68–69, 2017.

ROSS, K. M. et al. Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with inflammatory markers in cord blood. **Wiley Online Library**, v. 76, n. 5, p. 18, 1 nov. 2016.

ROSS, S.; IMMUNOLOGY, D. C.-A. REVIEW OF; 2018, U. Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 411–433, 2018.

ROSSI, D. et al. Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. **Journal of Internal Medicine**, v. 285, n. 2, p. 215–222, 1 fev. 2018.

ROSSI, D. et al. Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. **Journal of Internal Medicine**, v. 285, n. 2, p. 215–222, 1 fev. 2019.

ROTHAN, H. A. et al. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. **Molecular Neurobiology** 2018 **56:4**, v. 56, n. 4, p. 2551–2557, 24 jul. 2018.

ROTHAUG, M.; BECKER-PAULY, C.; ROSE-JOHN, S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. **undefined**, v. 1863, n. 6, p. 1218–1227, 1 jun. 2016.

SANABRA, C.; MENGOD, G. Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, n. 1, p. 43–54, 1 jan. 2011.

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

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. **Biomarcadores em Medicina Biomarcadores em Medicina Biomarcadores em Medicina Biomarcadores em Medicina Biomarkers in Medicine**. [s.l.: s.n.].

SHAFIT-ZAGARDO, B.; GRUBER, R. C.; DUBOIS, J. C. The role of TAM family receptors and ligands in the nervous system: From development to pathobiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 188, p. 97–117, 1 ago. 2018.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 1 jun. 2017.

SILVA, L. B. et al. The Role of TNF- α as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, n. 1, p. 332–338, 2019a.

SILVA, M. et al. Overview of Brazilian Requirements for Therapeutic Equivalence of

Orally Inhaled and Nasal Drug Products. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 1–7, 2019b.

SIMAVLI, S. et al. Hepcidin, iron status, and inflammation variables among healthy pregnant women in the Turkish population. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 75–79, jan. 2014.

SINGH, S. et al. AMP-Activated Protein Kinase Restricts Zika Virus Replication in Endothelial Cells by Potentiating Innate Antiviral Responses and Inhibiting Glycolysis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 204, n. 7, p. 1810–1824, 1 abr. 2020.

SIRONI, M. et al. A Common Polymorphism in TLR3 Confers Natural Resistance to HIV-1 Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 818–823, 15 jan. 2012.

SONG, Q. et al. **The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases** **Translational Neurodegeneration** BioMed Central Ltd., , 11 maio 2020. Disponível em: </pmc/articles/PMC7212675/>. Acesso em: 30 jun. 2021

SPENCE, T. et al. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. **Journal of Pregnancy**, v. 2021, 2021.

STOKKELAND, L.; GISKEØDEGÅRD, G.; STRIDSKLEV, S. Padrões de citocinas séricas na primeira metade da gravidez. **Cytokine**, 2019.

STUDZIŃSKA, M. et al. Association of TLR3 L412F Polymorphism with Cytomegalovirus Infection in Children. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169420, 1 jan. 2017.

SUBHA, M. et al. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 8, p. 666–672, 16 nov. 2016.

TABATA, T. et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. **Cell Host Microbe**, v. 20, p. 155–166, 2016.

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 5 maio 2016.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 1 jun. 2016.

TEIXEIRA, H. M. P. et al. Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. **Molecular Immunology**, v. 82, p. 137–145, 1 fev. 2017.

THARAKAN, B.; MANYAM, B. V. Botanical therapies in chronic fatigue. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 2, p. 91–95, 2006.

VALLADA FILHO, H. P.; SAMAIA, H. Esquizofrenia: aspectos genéticos e estudos

de fatores de risco. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, n. suppl 1, p. 2–4, maio 2000.

VINHAES, C. L. et al. Newborns with zika virus-associated microcephaly exhibit marked systemic inflammatory imbalance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, 2020.

WALSH, J. et al. Inflammasomes in the CNS. **nature.com**, [s.d.].

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 3, p. e13, 2017.

WANG, Z. et al. Notch signaling facilitates hepatitis B virus covalently closed circular DNA transcription via cAMP response element-binding protein with E3 ubiquitin ligase-modulation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

WARRINGTON, N. et al. The cyclic AMP pathway is a sex-specific modifier of glioma risk in type I neurofibromatosis patients. **Cancer research**, v. 75, n. 1, p. 16–21, 1 jan. 2015.

WERNER, H. et al. First-trimester in

trauterine Zika virus infection and brain pathology: prenatal and postnatal neuroimaging findings. **Prenatal Diagnosis**, v. 36, n. 8, p. 785–789, 1 ago. 2016.

XAVIER-CARVALHO, C. et al. Association of rs1285933 single nucleotide polymorphism in CLEC5A gene with dengue severity and its functional effects. **Human Immunology**, v. 78, n. 10, p. 649–656, 1 out. 2017.

XIE, S. et al. Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes of adenylate cyclase-associated protein in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 27216–27239, 2017.

ZHANG, X. et al. Epigenetically regulated miR-449a enhances hepatitis B virus replication by targeting cAMP-responsive element binding protein 5 and modulating hepatocytes phenotype. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 3 maio 2016.

ZONCU, R. et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 678–683, 4 nov. 2011.

ANEXOS

Anexo A. Níveis plasmáticos do TNF-alfa em gestantes com infecção pelo zika vírus (ZIKV) e sua relação com gravidade da síndrome congênita: revisão sistemática e metanálise.

Carta de aceite:

RESEARCH, SOCIETY AND DEVELOPMENT

Letter of Acceptance

The manuscript entitled "Níveis plasmáticos do TNF-alfa em gestantes com infecção pelo zika vírus (zikv) e sua relação com gravidade da síndrome congênita: revisão sistemática e metanálise", submitted on "08/05/2021" was accepted for publication and will be published within 30 days in the Research, Society and Development Journal - ISSN 2525-3409.

The manuscript is authored by:

Emile Ivana Fernandes Santos Costa, Murilo de Jesus Porto, Danilo Ferreira de Sousa, Camila Alexandrina Viana Figueiredo and Valdirene Leão Carneiro Leão Carneiro.

São Paulo, August 12, 2021, [Brazil](#).


Dr. Ricardo Shiitsuka
Editor

Artigo de Revisão:

Níveis plasmáticos do TNF-alfa em gestantes com infecção pelo zika vírus (ZIKV) e sua relação com gravidade da síndrome congênita: revisão sistemática e metanálise

Plasma TNF-alfa levels in pregnant women with zika virus (zikv) infection and its relationship to congenital syndrome severity: systematic review and metanalysis

Niveles de TNF-alfa plasmático en mujeres embarazadas con infección por el virus zika (zikv) y su relación con la gravedad del síndrome congénito: revisión sistemática y metálisis

Recebido: 05/08/2021 | Revisado: 09/08/2021 | Aceito: 00/08/2021 | Publicado: 00/08/2021

Emile Ivana Fernandes Santos Costa

ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-6509-1279>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: emilecostaivana@gmail.com

Valdirene Leão Carneiro

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-0655-3362>

Universidade do Estado da Bahia, Brasil

E-mail: valeao@hotmail.com

Camila Alexandrina Viana Figueiredo

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-1356-6188>

Universidade Federal da Bahia, Brasil

E-mail: cavfigueiredo@gmail.com

Murilo de Jesus Porto

ORCID: <https://orcid.org/0000-0003-2339-8173>

Universidade Federal da Bahia, Bahia

E-mail: murilo.porto@hotmail.com

Resumo

O processo patológico ocasionado pelo vírus zika (ZIKV), que é transmitida por mosquitos do gênero *Aedes*, apresenta distintos sinais e sintomas, havendo uma certa dificuldade em achados de biomarcadores genéticos, bioquímicos ou imunológicos, indicando alterações a nível de tecidos alvos. Assim, o estudo tem como objetivo verificar se o aumento da expressão ou dos níveis plasmáticos de TNF-alfa em gestantes com infecção pelo ZIKV estão associados com a ocorrência/gravidade da Síndrome Congênita. Como processo metodológico, trata-se de uma revisão sistemática da literatura, seguindo as recomendações do protocolo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses*

(PRISMA) para revisões sistemáticas e metanálise. Os estudos foram pesquisados nas fontes de dados Scielo, Pubmed, LILACS e Scopus, onde todas as análises foram realizadas pelo software REVMAN 5.4 (The Cochrane Collaboration, 2020). Devido à heterogeneidade desses estudos incluídos na metanálise, foi selecionado o modelo de efeitos aleatórios (*random-effects model*), sendo utilizados sete trabalhos. Os resultados e discussão indicam que os achados nos estudos indicados valores de I^2 elevado (95%; $p < 0,01$) para o desfecho, mostrando heterogeneidade considerável, os resultados demonstram que há uma elevação considerável da citocina TNF- α na SCZ, sendo que o papel do TNF- α tanto nas doenças infecciosas quanto nas inflamações agudas e crônicas, vem sendo cada vez mais descrito, para tentar entender melhor a dinâmica da resposta de defesa do organismo as partículas invasoras que o acometem. Quando a produção de citocinas pró-inflamatórias, ficando evidente a presença de níveis plasmáticos de TNF- α em gestantes com infecção pelo ZIKV como marcadores biológicos.

Palavras-chave: vírus zika; síndrome congênita; níveis de TNF; expressão de TNF; gravidez; gravidade.

Abstract

The pathological process caused by the Zika virus (ZIKV), which is transmitted by mosquitoes of the *Aedes* genus, presents different signs and symptoms, with some difficulty in finding genetic, biochemical or immunological biomarkers, indicating alterations at the level of target tissues. Thus, the study aims to verify whether the increased expression or plasma levels of TNF- α in pregnant women with ZIKV infection are associated with the occurrence/severity of the Congenital Syndrome. As a methodological process, it is a systematic literature review, following the recommendations of the Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses (PRISMA) protocol for systematic reviews and meta-analysis. The studies were searched in the Scielo, Pubmed, LILACS and Scopus data sources, where all analyzes were performed using the REVMAN 5.4 software (The Cochrane Collaboration, 2020). Due to the heterogeneity of the studies included in the meta-analysis, the random-effects model was selected, and seven studies were used. The results and discussion indicate that the findings in the studies indicated high I^2 values (95%; $p < 0.01$) for the outcome, showing considerable heterogeneity, the results demonstrate that there is a considerable elevation of the cytokine TNF- α in SCZ, being that the role of TNF- α both in infectious diseases and in acute and chronic inflammation has been increasingly described, in an attempt to better understand the dynamics of the body's defense response to the invading particles that affect it. When the production of proinflammatory cytokines, the presence of plasma levels of TNF- α in pregnant women with ZIKV infection becomes evident as biological markers.

Keywords: Zika virus; congenital syndrome; TNF levels; TNF expression; pregnancy; severity.

Resumen

El proceso patológico provocado por el virus Zika (ZIKV), que es transmitido por mosquitos del género *Aedes*, presenta diferentes signos y síntomas, con cierta dificultad para encontrar biomarcadores genéticos, bioquímicos o inmunológicos, indicando alteraciones a nivel de tejidos diana. Por lo tanto, el estudio tiene como

objetivo verificar si el aumento de la expresión o los niveles plasmáticos de TNF-alfa en mujeres embarazadas con infección por ZIKV están asociados con la aparición / gravedad del síndrome congénito. Como proceso metodológico, es una revisión sistemática de la literatura, siguiendo las recomendaciones del protocolo Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysis (PRISMA) para revisiones sistemáticas y metaanálisis. Los estudios se buscaron en las fuentes de datos Scielo, Pubmed, LILACS y Scopus, donde todos los análisis se realizaron utilizando el software REVMAN 5.4 (The Cochrane Collaboration, 2020). Debido a la heterogeneidad de los estudios incluidos en el metanálisis, se seleccionó el modelo de efectos aleatorios y se utilizaron siete estudios. Los resultados y la discusión indican que los hallazgos en los estudios indicaron valores altos de I² (95%; $p < 0.01$) para el resultado, mostrando una heterogeneidad considerable, los resultados demuestran que hay una elevación considerable de la citocina TNF- alfa en SCZ , siendo que se ha descrito cada vez más el papel del TNF- alfa tanto en enfermedades infecciosas como en la inflamación aguda y crónica, en un intento por comprender mejor la dinámica de la respuesta de defensa del organismo ante las partículas invasoras que lo afectan. Cuando se produce la producción de citocinas proinflamatorias, la presencia de niveles plasmáticos de TNF- alfa en mujeres embarazadas con infección por ZIKV se hace evidente como marcadores biológicos.

Palabras clave: Virus del Zika; síndrome congénito; niveles de TNF; expresión de TNF; embarazo; gravedad.

1. Introdução

Os primeiros relatos da infecção pelo Zika vírus (ZIKV) em humanos ocorreram por volta de 1952, através do isolamento de anticorpos neutralizantes contra o ZIKV no continente africano e em pouco tempo houve registros em pacientes asiáticos, devido à proximidade geográfica entre os continentes. Até então, essas infecções possuíam características bastante limitadas, acometendo um pequeno número de pessoas que não apresentavam gravidades (Da Silva et al., 2017; Ojha et al., 2018). O ZIKV está inserido no grupo dos arbovírus, que são aqueles vírus transmitidos por artrópodes hematófagos, e pertence a família *Flaviviridae* que também estão outros vírus de grande importância na saúde pública, como vírus Dengue (DENV), vírus da Febre Amarela (YFV), vírus da Encefalite Japonesa e vírus Chikungunya (PETRÔNIO et al., 2018).

Em 60 anos, menos de 20 casos de ZIKV foram confirmados na África e na Ásia, isso devido a dificuldade de diferenciar a sintomatologia (febre, erupção cutânea, artralgia, conjuntivite) entre as infecções pelos diferentes flavivírus, bem como pela reatividade cruzada com o vírus dengue (BAUD et al., 2017; MUSSO; CAO-LORMEAU; GUBLER, 2015). Em 2007 ocorreu um surto epidêmico na ilha Yap

(Micronésia), bem como em outros países asiáticos, e entre os anos 2013 e 2014, a Polinésia Francesa viveu seu maior surto de ZIKV, e foram associados a relação entre a infecção pelo vírus Zika e desordens neurológicas, como na Síndrome de Guillan Barré e na Síndrome Congênita do Zika (DE OLIVEIRA; DA COSTA VASCONCELOS, 2016; OJHA et al., 2018).

Diante do tamanho impacto social ocasionado pela infecção pelo Zika, encontramos como desafio a descoberta de biomarcadores que possam direcionar corretamente seu diagnóstico e tratamento. Numa definição geral, biomarcadores genéticos, bioquímicos ou imunológicos dizem respeito às moléculas que aumentam ou diminuem suas expressões em resposta a algum processo patológico (SCHRIEFER; CARVALHO, 2008; SILVA et al., 2019b).

A resposta imune que acontece durante um quadro de infecção viral, é resultado da interação das células de defesa, como macrófagos e natural killer, e as condições gerais do paciente, incluindo alimentação, comorbidades e características genéticas. O TNF- alfa pertence ao grupo das citocinas pró-inflamatórias, responsável por iniciar o combate ao microrganismo invasor através da ativação dos linfócitos T e B (SILVA et al., 2019b). Muitos estudos fizeram uma relação entre a infecção pelo ZIKV e alterações neurológicas graves, utilizando ensaios *in vivo/in vitro*, demonstraram que fetos expostos a níveis aumentados de TNF-alfa, no ambiente intrauterino, apresentam um quadro de neuroinflamação acentuada, prejudicando o processo da neurogênese (LUM et al., 2019; NEM DE OLIVEIRA SOUZA et al., 2018).

Kam et al. (2017) realizaram uma investigação para verificar o perfil imunológico de pacientes gestantes durante a fase de infecção aguda pelo ZIKV. Eles encontraram que os níveis de TNF-alfa materno foram maiores naquelas gestantes que deram luz a crianças com malformações congênitas comparados as concentrações daquelas gestantes que tiveram seus bebês normais. Esses resultados apresentados por Kam e colaboradores, levantou a possibilidade de utilizar o TNF-alfa como biomarcador de diagnostico, para garantir melhores abordagens clínica e terapêutica em futuros surtos do ZIKV. Portanto, diante da existência de poucos trabalhos disponíveis com essa temática, na literatura, torna-se necessário realizar mais trabalhos nessa linha. Assim, o presente estudo tem como objetivo verificar se o aumento da expressão ou dos níveis plasmáticos de TNF-alfa

em gestantes com infecção pelo ZIKV estão associados com a ocorrência/gravidade da Síndrome Congênita.

2. Metodologia

Estratégias de busca e seleção dos artigos

O presente estudo trata-se de uma revisão sistemática da literatura seguindo as recomendações do protocolo *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA) para revisões sistemáticas e metanálise. Os estudos foram pesquisados nas fontes de dados Scielo, Pubmed, LILACS e Scopus. Como critérios de inclusão, foram considerados trabalhos com as características a seguir: presença de pelo menos uma gestante na população de estudo; com confirmação laboratorial de infecção pelo ZIKV; apenas estudos em humanos; somente artigos publicados; cujo desenho fosse do tipo caso-controle, coorte, relato de caso; e sem restrição temporal. Foram excluídos aqueles estudos que relatavam coinfeções por outros vírus que também desencadeiam anormalidades congênicas, como STORCH (Sífilis-Toxoplasmose-Rubéola-Citomegalovírus-Herpes vírus) e arbovírus (Dengue e Chikungunya); estudos de revisão de literatura, revisão editorial, estudos *in vitro/in vivo*, estudos utilizando vetores, estudos com alto risco de viés, além dos estudos duplicados entre as bases de dados. A busca dos estudos foi realizada com uso dos descritores “TNF expression”, “TNF level”, “severity”, “congenital zika vírus syndrome”, “congenital zika syndrome”, “pregnant”, “pregnant women”, “TNF”, “ZIKV”, combinados com os operadores booleanos AND e OR.

Avaliação do risco de viés

Para o método de avaliação do risco do viés, a presente amostra foi selecionada a partir de uma condição clínica de interesse, com as devidas buscas dos descritores, indicando em seguida a seleção dos periódicos pesquisados, sendo divididos por método de seleção, critério de escolha e qualidade das informações cabíveis no texto, sendo utilizado também recursos do sistema GRADE (<https://gdt.gradepro.org/>) para avaliar o risco de viés de seleção, comparabilidade, exposição e outros vieses entre os estudos. Já para avaliação do risco de viés

individual foi utilizada a escala de Newcastle Ottawa Scale (NOS), para estudos observacionais do tipo caso-controle.

Extração dos dados

Os estudos incluídos foram avaliados de forma individual por dois autores. Os dados foram extraídos em uma tabela padrão no Microsoft Word e consistem em autor/ano, objetivos, métodos, principais resultados, desfechos, síntese estatística e análise de viés.

Análise estatística

Todas as análises foram realizadas pelo software REVMAN 5.4 (The Cochrane Collaboration, 2020). Devido à heterogeneidade desses estudos incluídos na metanálise, foi selecionado o modelo de efeitos aleatórios (*random-effects model*). O I^2 foi calculado para avaliação da magnitude entre os estudos, sendo o valor de $I^2 > 50\%$ significando dizer que a heterogeneidade é substancial e $I^2 > 75\%$ quer dizer que a heterogeneidade é considerável. Já o χ^2 foi calculado para avaliar a significância dessa heterogeneidade ($p < 0,10$).

3. Resultados

Seleção dos Estudos

A estratégia de busca utilizada nas bases de dados resultou em 81 estudos. Na triagem, 9 estudos duplicados foram excluídos, restando 72 artigos. Após a análise dos títulos e resumos de 72 artigos, 55 artigos foram excluídos, sendo 13 artigos de revisão; 33 desenhos de estudos não desejados; e 11 artigos com assunto diferente do que foi pesquisado. Dos 17 estudos elegíveis, 10 foram excluídos pois os artigos não apresentaram a síndrome congênita como desfecho principal. As buscas nas bases de dados resultaram em vinte e sete artigos incluídos na revisão sistemática e sete (se houver) na metanálise (Figura 1).

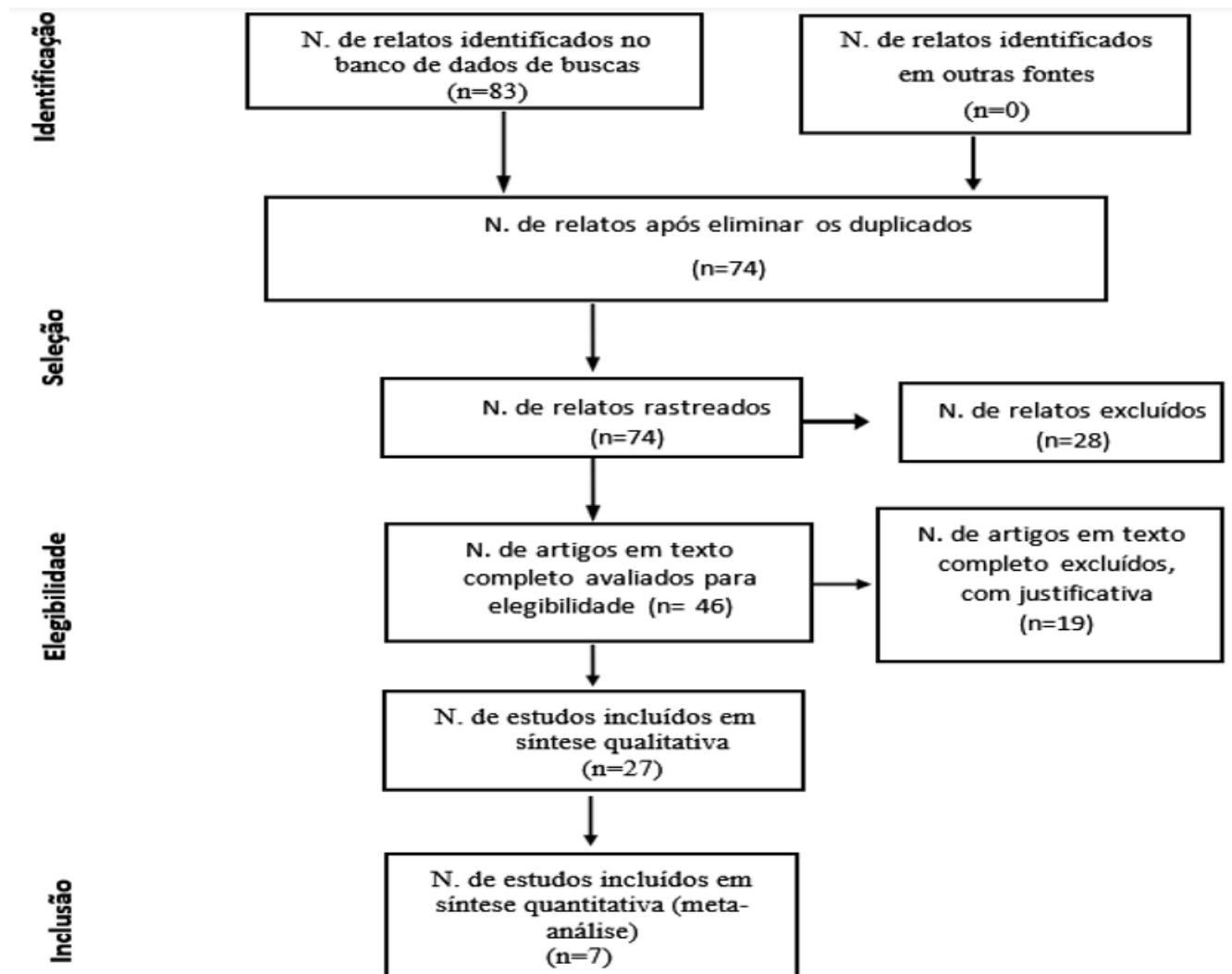
Características dos Estudos

Os estudos incluídos na revisão sistemática foram conduzidos em centros de pesquisas e laboratórios hospitalares de várias regiões do Brasil. O desenho dos estudos incluídos foi observacional do tipo caso-controle. Os estudos incluíram

participantes com diagnóstico laboratorial confirmado de infecção pelo ZIKV, através dos testes de RT-PCR e/ou dosagem de IgM/IgG contra antígenos do vírus. A descrição detalhada dos estudos incluídos está representada no quadro 1.

Risco de viés

Sobre o viés de seleção, todos os estudos (7/7; 100%) utilizaram amostra por conveniência para a composição dos grupos caso-controle, não havendo randomização desses participantes. Isso está associado a um alto risco de viés, já que não houve seleção através do sorteio, caracterizando o cegamento inclusive um dos artigos relata que a alocação dos participantes foi realizada em diferentes regiões do Brasil, o que aumenta esse tipo de viés, pois os autores estão trabalhando com amostra expostas a condições ambientais, sociais e genéticas bastante variadas (figura 2 e quadro 2).

Figura 1: Fluxograma de seleção dos estudos.

Fonte: Própria autoria, 2021.

Quadro 1: Características dos estudos incluídos.

Autor/ano	Objetivo	Método	Principais resultados	Desfechos	Síntese estatística	Análise de viés
CAMACHO-ZAVALA et al., 2021	Descrever o papel da gravidez na resposta sistêmica pró e anti-inflamatória durante a infecção sintomática do ZIKV.	Caso-controle	As gestantes com infecção por ZIKV apresentaram um aumento significativo nas citocinas IL-10 e pró-inflamatórias IL-6, TNF- α , IL-17A, IFN- α e IFN- γ mas não IL-1 β , o que pode influenciar no desfecho da SCZ.	Os dados mostram que mulheres não grávidas e grávidas infectadas pelo ZIKV mostram a resposta ampla e anti-inflamatória esperada com altos níveis de citocinas e atividade antiviral provavelmente mediada pelo IFN- γ .	As gestantes infectadas pelo ZIKV apresentaram aumento significativo nos níveis de TNF- α comparadas com seus controles saudáveis (mediana: 1,17; Q3: 2,85; P:0,0484).	Moderado
DA SILVA et al., 2019	Avaliar a expressão de mRNA de receptores da imunidade inata, suas moléculas adaptadoras e citocinas em pacientes na fase aguda da infecção pelo ZIKV.	Caso-controle	Os pacientes infectados pelo ZIKV apresentaram expressão reduzida de RIG-1, TLR8, Myd88, TNF- α .	Durante a gestação, mulheres infectadas com ZIKV apresentaram níveis aumentados de mediadores imunológicos como TNF- α .		Moderado
KAM et al., 2017	Investigar a resposta clínica e imunológica, com	Caso-controle	Gestantes portadoras de feto com anomalias do desenvolvimento	Altos níveis de TNF- α detectáveis na maior gravidade da SCZ.	Pacientes ZIKV (+) apresentaram níveis aumentados de TNF-	Moderado

	foco no perfil de mediadores imunológicos em 95 pacientes adultos infectados pelo ZIKV.		fetal apresentaram níveis muito altos de TNF-alfa.		α quando comparados com pacientes ZIKV (-) e controles ($p < 0,001$). Mulheres grávidas apresentaram níveis significativamente aumentados de TNF- α ($p < 0,5$).	
NAVECA et al., 2018	Definir os biomarcadores imunológicos que se correlacionam com a infecção aguda por ZIKV.	Caso-controle	Os pacientes infectados pelo ZIKV apresentaram resposta inflamatória sistêmica aumentada. Entretanto, os níveis da citocina TNF- α encontrados nos mesmos estavam reduzidos nos indivíduos do grupo caso, quando comparados aos seus controles.	Uma resposta aumentada de diversos biomarcadores em diferentes momentos da infecção pelo ZIKV, demonstraram que há uma associação entre os níveis dessas citocinas e a permeabilidade da barreira hematoencefálica e neuroinvasão, o que reflete no desfecho de gravidade da SCZ.	Níveis de TNF- α de 29 mulheres foram dosados encontrando as seguintes concentrações: 9,76 (IC: 6,10-20,20) pg / mL (não infectadas) e 35,87 (IC: 25,45-44,08) pg/mL (infectadas) com $p = 0,0001$.	Moderado
SANTOS et al., 2019	Testar SNPs em genes candidatos CD209, TNF- α , CXCL8, IL-6, CCL-2, TLR-3, TRL-4 e MICB para investigar sua associação com a SCZ.	Caso-controle	O SNP rs3775291 no gene TLR-3 desencadeia respostas antivirais em mães infectadas pelo ZIKV durante a gravidez, e está associado a ocorrência da SCZ; O SNP rs1799964 no gene TNF-alfa em	Variações nos genes TLR3 e TNF α associadas a respostas imunes inatas em mães grávidas infectadas com ZIKV e seus bebês CZS podem influenciar o risco de ocorrência e gravidade	Os autores não encontraram diferenças significativas entre os grupos caso-controle de mães (OR: 0,87; IC95%: 0,37-2,01; P-0,82) ou de bebês (OR: 1,28; IC95%: 0,53-2,91; P-0,64)	Moderado

			bebês com SCZ está associado a microcefalia grave.	da microcefalia	associadas ao SNP rs1799964 no gene TNF- α . O alelo T do SNP rs1799964 no TNF- α foi associado a microcefalia grave no grupo caso de bebês com SCZ (OR, 2,63; IC 95%, 1,13-6,21; p = 0,03).	
VINHAES et al., 2020	Compreender o perfil inflamatório e o grau de inflamação das pessoas infectadas pelo ZIKV.	Caso-controle	Recém-nascidos com microcefalia apresentaram níveis de citocinas, como TNF-alfa, aumentados de maneira marcante.	Intenso desequilíbrio inflamatório proporcional à gravidade da microcefalia associada ao ZIKV, com aumento do TNF- α .	Foram detectados que crianças com microcefalia apresentaram 66,93 (21,83-130,72) pg/mL, enquanto aquelas que mesmo após exposição ao ZIKV não desenvolveram microcefalia apresentaram 23,26 (7,88-56,03) pg/mL (p<0,01).	Moderado
BARROS et al., 2018	Determinar o perfil de ativação imune sistêmica durante a infecção aguda pelo ZIKV em residentes de uma área endêmica e determinar se diferentes	Caso-controle	Pacientes com infecção pelo ZIKV apresentaram níveis de TNF-alfa reduzidos.	Infecção aguda pelo ZIKV exibe um perfil de ativação imune sistêmico modesto, envolvendo citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e imunorreguladoras.	A concentração de TNF- α plasmático foi reduzida nos pacientes com infecção 0,06 pg/mL (p<0,05).	Moderado

	sintomas estavam relacionados a níveis diferenciais de citocinas / quimiocinas específicas					
--	--	--	--	--	--	--

*SCZ: Síndrome Congênita do Zika; ZIKV: Vírus Zika; SNP: Polimorfismo de Nucleotídeo Único

Fonte: Própria autoria, 2021.

Avaliação de certeza							Nº de pacientes		Efeito		Certeza	Importância
Nº dos estudos	Delineamento do estudo	Risco de vies	Inconsistência	Evidência indireta	Imprecisão	Outras considerações	TNF	Sem a característica	Relativo (95% IC)	Absoluto (95% IC)		
Novo desfecho												
7	estudo observacional	não grave	não grave	não grave	não grave	todos os potenciais fatores de confusão reduziram o efeito demonstrado	277 casos 54 controles		não combinado	-	⊕⊕⊕○ MODERADA	CRÍTICO
							-	30.0%		não combinado		

IC: Intervalo de Confiança

Figura 2: Avaliação de viés entre os estudos (sistema GRADE).

Fonte: Própria autoria, 2021.

Quadro 2: Newcastle-Ottawa escala dos estudos incluídos

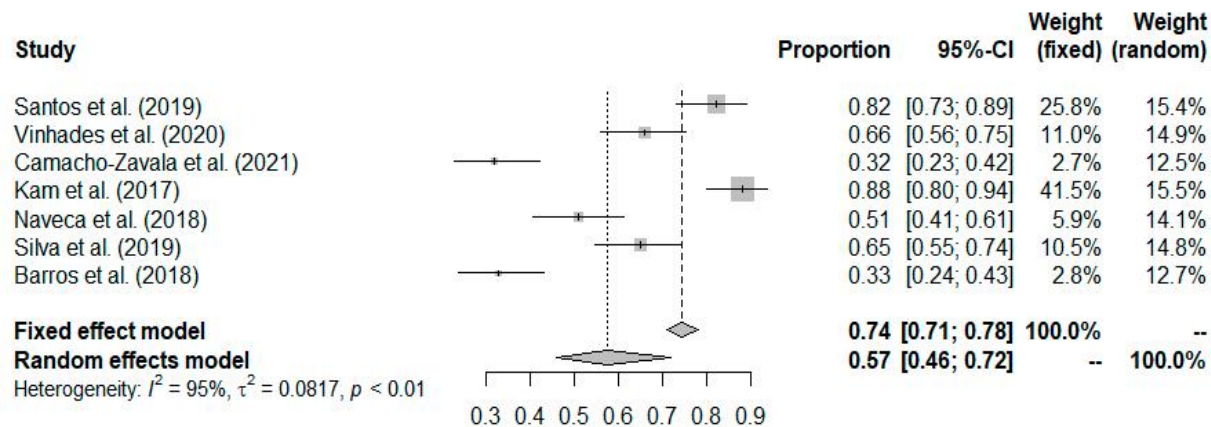
	Seleção				Comparabilidade	Exposição		
Estudo	Definição adequada dos casos	Representatividade dos casos	Seleção dos controles	Definição dos controles	Comparação entre os casos e controles	Averiguação	Comparação entre os métodos de investigação entre os casos e controles	Taxa de não resposta
CAMACHO-ZAVALA et al., 2021	*		*	*	*	*	*	*
DA SILVA et al., 2019	*		*	*	*	*	*	*
BARROS et al., 2018	*		*	*	*	*	*	*
KAM et al., 2017	*		*	*	*	*	*	*
NAVECA et al., 2018	*		*	*	*	*	*	*
SANTOS et al., 2019	*		*	*	*	*	*	*
VINHAES et al., 2020	*		*	*	*	*	*	*

Fonte: Própria autoria, 2021.

Metanálise

Sete estudos foram incluídos na metanálise (BARROS et al., 2018; CAMACHO-ZAVALA et al., 2021; KAM et al., 2017; NAVECA et al., 2018; SANTOS et al., 2019; SILVA et al., 2019a; VINHAES et al., 2020). Todos apresentaram o valor de I^2 elevado (95%; $p < 0,01$) para o desfecho. Mesmo com heterogeneidade considerável, os resultados demonstram que há uma elevação considerável da citocina TNF- α na SCZ (figura 3).

Figura 3: *Forest plot.*



Fonte: Própria autoria, 2021.

4. Discussão

As citocinas são pequenas moléculas, de aproximadamente 5-20 kDa, essenciais para o processo de sinalização celular, incluindo a ativação do sistema imunológico, através da modulação do comportamento das células de defesa próximas, ou até mesmo distantes do local da infecção por microrganismos invasores. Fazem parte dessas moléculas as interleucinas (IL),

interferons (IFNs), fatores de crescimento (FC), quimiocinas (CKs) e fator de necrose tumoral (TNF). O TNF- alfa é uma citocina pró-inflamatória multifuncional, produzida principalmente pelos macrófagos, com papel muito importante na ativação das respostas imunes inata e adaptativa juntamente com interleucinas do tipo IL-1 α , IL-1 β , IL-6 e IL-8 (Higuchi et al., 1998 & Silva et al., 2019).

O papel do TNF- alfa tanto nas doenças infecciosas quanto nas inflamações agudas e crônicas, vem sendo cada vez mais descrito, para tentar entender melhor a dinâmica da resposta de defesa do organismo as partículas invasoras que o acometem. Quando a produção de citocinas pró-inflamatórias ocorre em excesso, aumenta a resposta imune do hospedeiro, porém causa efeitos deletérios a homeostase do organismo, já que para ocorrer uma resposta imune adequada é necessária uma comunicação equilibrada entre as células, o ambiente e a genética do hospedeiro (Silva et al., 2019).

Neste estudo foi demonstrado que o aumento da expressão ou dos níveis plasmáticos de TNF- alfa em gestantes com infecção pelo ZIKV estão associados com a ocorrência/gravidade da Síndrome Congênita, nos estudos incluídos nesta metanálise, há realmente um aumento da expressão e/ou concentração dessa citocina tão importante na modulação da resposta imune.

Embora as citocinas representem um grupo de moléculas que apresentam níveis aumentados no plasma sanguíneo, elas na maioria dos casos, estão associadas a sintomas mais leves da infecção pelo ZIKV. Isso pode ser explicado por um equilíbrio entre citocinas pró e anti-inflamatórias, e as quimiocinas, considerado um distúrbio homeostático imune associado ao desacoplamento da inflamação sistêmica, desenvolvido através de uma reatividade imunológica cruzada entre os arbovírus ZIKV, dengue (DENV) e febre amarela (AFV), além do alto índice de vacinação contra a AFV nas regiões endêmicas onde há co-circulação desses vírus (BRASIL, 2015b; MACIEL; JÚNIOR; MARTELLI, 2008).

Nos estudos de Camacho-Zavala et al. (2021) e Barros et al. (2018) não foi descrito aumento da expressão/níveis de TNF- alfa nos grupos casos, representados por crianças microcefálicas que foram expostas ao ZIKV durante a vida intrauterina, o que pode ser confirmado estatisticamente pelo forest plot da nossa metanálise com valores de 0.32 e 0.33 (IC 0.23-.42; e IC 0.24-0.43; $p < 0,01$, respectivamente). Já no estudo de Silva et al. (2019) foram avaliadas amostras de trinta pacientes, dez com

infecção confirmada pelo ZIKV através da técnica de RT-PCR, que fazem parte do grupo caso e vinte controles saudáveis. Eles realizaram a dosagem de citocinas para verificar o comportamento delas durante a infecção aguda pelo ZIKV e observaram que houve uma baixa produção de TNF- alfa no plasma dos pacientes do grupo caso quando comparados com o grupo controle, com um valor de efeito 0.65 (IC 0.55-.74; $p < 0,01$) encontrado em nossa metanálise.

O equilíbrio inflamatório sistêmico é um possível fator de proteção que o organismo humano desenvolveu contra a infecção viral pelo Zika, por isso provavelmente existe algum fator secundário à resposta inflamatória acentuada, intensificando a coordenação desses processos que levam ao quadro de neuroinflamação acarretando o desfecho da microcefalia. Apesar do mecanismo da resposta imune antiviral ainda não ter sido totalmente elucidada, ela pode ser desencadeada pela regulação viral da expressão dos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs) envolvidos nas vias de resposta inflamatória antiviral (HAMEL et al., 2015).

Naveca et al. (2018), observaram que a resposta imunológica que se estabelece durante a fase aguda da infecção pelo ZIKV é polifuncional e altamente inflamatória, demonstrando níveis elevados de diversas citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento plasmáticos no grupo caso quando comparado com os controles. Entretanto, os níveis de TNF- alfa encontrados nesse estudo estavam reduzidos, podendo ser justificado pela atividade da adenosina monofosfato quinase (AMPK), que possui uma importante função antiviral, atuando como um sinalizador celular, capaz de alterar a resposta imunológica do hospedeiro durante a infecção pelo vírus. Vários estudos demonstraram que os níveis de AMPK estão inversamente relacionados com a intensidade da inflamação, o que significa que, em condições inflamatórias, essa proteína quinase apresentará atividade reduzida, sugerindo que a essa molécula promove uma resposta antiviral e que sua baixa regulação em células endoteliais infectadas pode ser uma estratégia usada pelo ZIKV para manobrar o sistema imunológico da célula hospedeira (KERUI et al., 2018; KUMAR; GIRI; KUMAR, 2016a, 2016b; MOREIRA et al., 2016). Os autores descreveram ainda, que as concentrações plasmáticas de TNF- alfa e CCL5 (uma quimiocinas) apresentavam uma forte correlação com as porcentagens de neutrófilos e linfócitos durante a fase aguda da infecção, o que pode ser justificado pela presença dessas moléculas atraindo leucócitos, fato que demonstra o

importante papel das mesmas na defesa imunológica, inata e adaptativa, em resposta à infecção pelo ZIKV (RABELO et al., 2018, 2020; SINGH et al., 2020).

Kam et al. (2017) avaliaram uma coorte de pacientes brasileiros de Campinas (SP), onde na época do estudo, a imunização contra a AFV não fazia parte do calendário vacinal obrigatório do SUS, e para investigar a resposta clínica e imunológica de 95 pacientes adultos com sintomas da infecção pelo ZIKV, sendo 6 dessas, gestantes. Ao nascer, amostras dos 6 recém-nascidos dessas gestantes e de 4 outros recém-nascidos também foram coletadas para avaliação dos desfechos da infecção nessas crianças. A confirmação da infecção foi realizada através de RT-PCR em tempo real e ELISA específica para detecção de anticorpos do tipo IgG. Foram incluídos ao estudo 13 indivíduos saudáveis para composição do grupo controle. A fim de construir um perfil de resposta imunológica no quadro da infecção pelo ZIKV, eles mediram as citocinas plasmáticas através do imunoensaio baseado em microesfera multiplex, a quantificaram os níveis de TNF- alfa. Os níveis de várias citocinas pró-inflamatórias, como TNF- alfa, apresentaram aumento significativo quando comparados ao grupo controle, sugerindo uma produção ativa desses mediadores imunológicos durante a fase aguda da infecção. Do total de 10 recém-nascidos que foram expostos à infecção pelo ZIKV durante a vida intrauterina, apenas 2 nasceram com malformações congênitas.

Quando os autores avaliaram o perfil das grávidas com a infecção que pariram as crianças com anormalidades cerebrais, detectaram níveis muito altos de mediadores imunológicos, incluindo TNF- alfa, quando comparado com as grávidas que tiveram seus bebês normais. A concentração de TNF- alfa apresentaram resultados significativamente maiores durante a fase aguda do que a fase de convalescência da infecção, e ainda os autores destacam a importância dessa citocina ser mais bem avaliada como biomarcador de prognóstico para desfechos desfavoráveis à nível de sistema nervoso central (SNC). Esses dados estão em concordância com os nossos resultados, sendo esse estudo de Kam et al. (2017) aquele que representou o maior efeito (0,88) entre os níveis aumentados de TNF- alfa com a maior gravidade da SCZ (IC 0.80-0.94; $p < 0,01$).

Vinhaes *et al.* (2020) descreveram um estudo do tipo caso-controle comparando concentrações plasmáticas de biomarcadores inflamatórios de vinte e duas crianças que apresentaram microcefalia ao nascer, catorze crianças sem

microcefalia (apesar do contato com o ZIKV) e catorze crianças saudáveis de mães não expostas ao ZIKV. A confirmação da infecção pelo ZIKV foi realizada pelo teste do RT-PCR e IgM contra o vírus. Eles avaliaram vinte e seis marcadores imunológicos envolvidos no processo da inflamação, entre eles o TNF- alfa, que por sua vez apresentou concentração aumentada diante do quadro microcefálico quando comparados aos seus controles saudáveis, o que confirma o nosso resultado, mostrando que existe uma relação de 0.66 entre a elevação dos níveis do TNF- alfa e o desfecho de microcefalia (IC 0.56-0.75; $p < 0,01$).

Diversos estudos tentam elucidar a fisiopatologia do desfecho da microcefalia em crianças que foram expostas ao ZIKV ainda no útero. O que já se sabe é que a presença dessa infecção desregula a expressão dos genes associados à resposta imune, ciclo celular, diferenciação e morte celular por apoptose em células progenitoras neurais (FAIZAN et al., 2016; TANG et al., 2016). A ativação do receptor toll like 3 (TRL3) é capaz de desencadear resposta imune antiviral através da produção de citocinas pró-inflamatórias. O ZIKV é capaz de ativar respostas imunes inatas mediadas pelo TRL3 causando um desequilíbrio na rede de genes responsáveis pelos processos de neurogênese e apoptose. A ativação dessa resposta imunológica é importante para manter a barreira hematoencefálica (BAYER et al., 2016; DANG et al., 2016).

Santos et al. (2019) selecionaram setenta mulheres que tiveram bebês com SCZ no período entre 2015 e 2017, sendo uma dessas mães tinha gêmeos monozigóticos, ambos acometidos com a SCZ, o grupo caso foi composto por setenta e uma crianças e mais trinta pais, já o grupo controle foi composto por quarenta e quatro mães e seus filhos saudáveis. Eles encontraram uma associação entre o risco de SCZ e a presença do alelo T (SNP rs3775291) no gene TRL3 de mulheres que foram infectadas pelo ZIKV durante a gravidez, apresentando maior suscetibilidade à ocorrência da SCZ. Alguns estudos de genética das populações mostraram associação entre esse SNP e suscetibilidade a infecções virais, apesar disso, como isso acontece ainda não está totalmente definido. A presença do alelo T foi considerado como fator de proteção para dengue hemorrágica (ALAGARASU et al., 2015b), além de controlar a replicação viral na encefalite transmitida por carrapatos (KINDBERG et al., 2011), e na infecção pelo HIV-1 de células mononucleares *in vitro*, sendo também observado um aumento de citocinas pró-

inflamatórias, como a TNF- alfa, nas células que apresentavam pelo menos um alelo T nesse SNP (SIRONI et al., 2012). Contudo, corroborando com os achados de Santos et al. (2019), o estudo de (STUDZIŃSKA et al., 2017) mostrou que a presença de pelo menos um alelo T do SNP s3775291 aumenta o risco de infecções por citomegalovírus em crianças.

Uma associação também foi observada entre o alelo T (SNP rs1799964) no gene TNF- alfa e a ocorrência da microcefalia grave nas crianças com microcefalia. A presença desse alelo T em crianças recém-nascidas sugere uma resposta inflamatória acentuada, o que reduz a defesa do feto contra o vírus, consequentemente aumentando a carga viral do ZIKV e seu potencial de causar anormalidades nos neurônios fetais (HIGUCHI et al., 1998; KASZTELEWICZ et al., 2017), estando em concordância com os nossos resultados, já que o estudo do Silva et al. (2019) apresentou 0.82 (IC 0.73-0.89; $p < 0,01$) de relação entre a elevação do TNF- alfa e a presença da microcefalia em recém-nascidos.

Importante ressaltar que a maioria dos estudos encontrados com estatística significativa mostra o perfil das grávidas com a infecção que pariram as crianças com anormalidades cerebrais, foi encontrado níveis muito altos de mediadores imunológicos, incluindo TNF- alfa, quando comparado com as grávidas que tiveram seus bebês normais, além disso as concentrações de TNF- alfa apresentaram resultados elevados durante a fase aguda do que a fase de convalescência da infecção. O resultado da nossa metanálise sugere que o aumento dos níveis do TNF- alfa está associado com o aumento da gravidade da SCZ.

5. Considerações Finais

A produção científica sobre a existência de um biomarcador de gravidade da infecção pelo ZIKV ainda é escassa. Os dados aqui apresentados demonstram existir uma relação entre a presença da citocina TNF- alfa e a gravidade do ZIKA vírus e mais estudos envolvendo este marcador devem ser realizados a fim de elucidar esta possibilidade. Outros estudos, com um melhor delineamento metodológico, devem ser realizados para que seja possível ampliar o entendimento sobre o comportamento das citocinas pró-inflamatórias, no contexto do desenvolvimento e gravidade da Síndrome Congênita do Zika vírus, a fim de contribuir para o prognóstico, diagnóstico e tratamento desse desfecho.

Referências

- AHUJA, N.; KUMAR, P.; BHATNAGAR, R. The adenylate cyclase toxins. **Critical Reviews in Microbiology**, v. 30, n. 3, p. 187–196, 2004.
- AKANEYA, Y.; TAKAHASHI, M.; HATANAKA, H. Interleukin-1 β Enhances Survival and Interleukin-6 Protects against MPP⁺ Neurotoxicity in Cultures of Fetal Rat Dopaminergic Neurons. **Experimental Neurology**, v. 136, n. 1, p. 44–52, 1 nov. 1995.
- ALAGARASU, K. et al. Polymorphisms in RNA sensing toll like receptor genes and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. **Immunobiology**, v. 220, n. 1, p. 164–168, 1 jan. 2015a.
- ALAGARASU, K. et al. Association of FCGR2A p.R131H and CCL2 c.-2518 A > G gene variants with thrombocytopenia in patients with dengue virus infection. **Human Immunology**, v. 76, n. 11, p. 819–822, 1 nov. 2015b.
- ALIJOTAS-REIG, J. et al. Tumor Necrosis Factor-Alpha and Pregnancy: Focus on Biologics. An Updated and Comprehensive Review. **Clinical Reviews in Allergy and Immunology**, v. 53, n. 1, p. 40–53, 1 ago. 2017.
- ALL, C. et al. Ischemia-induced interleukin-6 as a potential endogenous neuroprotective cytokine against NMDA receptor-mediated excitotoxicity in the brain. **Journal of cerebral blood flow and metabolism**, v. 20, n. 6, p. 956–966, 2000.
- ANAYA, J. M. et al. A comprehensive analysis and immunobiology of autoimmune neurological syndromes during the Zika virus outbreak in Cúcuta, Colombia. **Journal of autoimmunity**, v. 77, p. 123–138, 1 fev. 2017.
- BARROS, J. B. DE S. et al. Acute Zika virus infection in an endemic area shows modest proinflammatory systemic immunoactivation and cytokine-symptom associations. **Frontiers in Immunology**, v. 9, n. MAY, 2018.
- BAUD, D. et al. An update on Zika virus infection. **The Lancet**, v. 390, n. 10107, p. 2099–2109, 4 nov. 2017.
- BAYER, A. et al. Type III Interferons Produced by Human Placental Trophoblasts Confer Protection against Zika Virus Infection. **Cell Host & Microbe**, v. 19, n. 5, p. 705–712, 11 maio 2016.
- BENVENISTE, E. N. Cytokine actions in the central nervous system. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 9, n. 3–4, p. 259–275, 1 dez. 1998.
- BJÖRKANDER, S. et al. Pregnancy-associated inflammatory markers are elevated in pregnant women with systemic lupus erythematosus. **Cytokine**, v. 59, n. 2, p. 392–399, 2012.
- BJÖRKANDER, S.; BREMME, K.; PERSSON, J. Marcadores inflamatórios associados à gravidez estão elevados em mulheres grávidas com lúpus eritematoso sistêmico. **Cytokine**, 2012.
- BLACKMORE, E. et al. Psychiatric symptoms and proinflammatory cytokines in pregnancy. **Psychosomatic Medicine**, v. 73, n. 8, p. 656–663, 2011.

BORDA, V. et al. Whole-exome sequencing reveals insights into genetic susceptibility to Congenital Zika Syndrome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009507, 1 jun. 2021a.

BORDA, V. et al. Whole-exome sequencing reveals insights into genetic susceptibility to Congenital Zika Syndrome. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 6, p. e0009507, 14 jun. 2021b.

BORISH, L. C.; STEINKE, J. W. Cytokines and chemokines. **Journal of Allergy and Clinical Immunology**, v. 111, n. 2, p. S460–S475, 2003.

BOYLE, A. P. et al. Annotation of functional variation in personal genomes using RegulomeDB. **Genome Research**, v. 22, n. 9, p. 1790–1797, 1 set. 2012.

BRANT, S. R. et al. Genome-Wide Association Study Identifies African-Specific Susceptibility Loci in African Americans With Inflammatory Bowel Disease. **Gastroenterology**, v. 152, n. 1, p. 206- 217.e2, 1 jan. 2017.

BRASIL. Resumo executivo Saúde Brasil 2015/2016: uma análise da situação de saúde e da epidemia pelo vírus Zika e por outras doenças transmitidas pelo Aedes aegypti. 2015a.

BRASIL. **Ministério da Saúde Secretaria Atenção à Saúde PROTOCOLO DE ATENÇÃO À SAÚDE E RESPOSTA À OCORRÊNCIA DE MICROCEFALIA RELACIONADA À INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA**. [s.l: s.n.]. Disponível em: <www.saude.gov>. Acesso em: 3 jul. 2021b.

BRASIL, P. et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. **New England Journal of Medicine**, v. 375, n. 24, p. 2321–2334, 15 dez. 2016.

CAIRES-JÚNIOR, L. C. et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. **Nature Communications**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2018.

CAMACHO-ZAVALA, E. et al. Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with CXCL10 Increase. **Viruses**, v. 13, n. 1, 2021.

CAMPOS, G. S. et al. New Challenge for Zika Virus Infection: Human Reservoirs? **Viral Immunology**, v. 33, n. 6, p. 489–492, 1 jul. 2020.

CARSON, W. E. et al. Interleukin (IL) 15 is a novel cytokine that activates human natural killer cells via components of the IL-2 receptor. **The Journal of experimental medicine**, v. 180, n. 4, p. 1395–1403, 1 out. 1994.

CESARIS, P. DE et al. O fator de necrose tumoral- α induz a produção de interleucina-6 e a expressão do ligante de integrina por vias de transdução distintas. **Journal of Biological**, 1998.

CHANG, C. et al. The Zika outbreak of the 21st century. **Journal of Autoimmunity**, v. 68, p. 1–13, 1 abr. 2016.

CHEN, J. et al. Outcomes of Congenital Zika Disease Depend on Timing of Infection and Maternal-Fetal Interferon Action. **Cell Reports**, v. 21, n. 6, p. 1588–1599, 7 nov.

2017.

CHIRAMEL, A. I.; BEST, S. M. **Role of autophagy in Zika virus infection and pathogenesis***Virus Research* Elsevier B.V., , 2 ago. 2018. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28899653/>>. Acesso em: 1 jul. 2021

CHRISTIAN, K. M.; SONG, H.; MING, G. L. Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. **Annual Review of Neuroscience**, v. 42, p. 249–269, 2019.

CIPRIANO, R.; MONTEIRO, C. C. A report about Zika virus in Brazil. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 6, n. 1, p. 37–40, 4 jan. 2016.

CLOËTTA, D. et al. Inactivation of mTORC1 in the developing brain causes microcephaly and affects gliogenesis. **Journal of Neuroscience**, v. 33, n. 18, p. 7799–7810, 2013.

COLAVITA, F.; BORDONI, V.; CAGLIOTI, C. ZIKV infection induces an inflammatory response but fails to activate types I, II, and III IFN response in human PBMC. **Mediators of inflammation**, v. 2018, 2018.

COOPER, D. M. F.; TABBASUM, V. G. **Adenylate cyclase-centred microdomains***Biochemical Journal* Portland Press Ltd, , 1 set. 2014. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/25102028/>>. Acesso em: 1 jul. 2021

COSTA, E. I. F. S. et al. Níveis plasmáticos do TNF-alfa em gestantes com infecção pelo Zika vírus (ZIKV) e sua relação com gravidade da síndrome congênita: revisão sistemática e metanálise. **Research, Society and Development**, v. 10, n. 10, p. e428101019080–e428101019080, 2021.

DA SILVA, E. et al. **ZIKA VÍRUS: FATORES EVOLUTIVOS DETERMINANTES PARA SUA EPIDEMIA E PATOGENIA***REVISTA SAÚDE INTEGRADA*. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <<http://local.cneccsan.edu.br/revista/index.php/saude/index>>. Acesso em: 9 jul. 2021.

DA SILVA, M. H. M. et al. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 208, n. 6, 2019.

DANG, J. et al. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 2, p. 258–265, 4 ago. 2016.

DANSAKO, H. et al. The cyclic GMP-AMP synthetase-STING signaling pathway is required for both the innate immune response against HBV and the suppression of HBV assembly. **FEBS Journal**, v. 283, n. 1, p. 144–156, 1 jan. 2016.

DE OLIVEIRA, C. S.; DA COSTA VASCONCELOS, P. F. Microcephaly and Zika virus. **Jornal de Pediatria**, v. 92, n. 2, p. 103–105, 1 mar. 2016.

DELGADO, M.; LECETA, J.; GANEA, D. Vasoactive intestinal peptide and pituitary adenylate cyclase-activating polypeptide inhibit the production of inflammatory mediators by activated microglia. **Journal of Leukocyte Biology**, v. 73, n. 1, p. 155–164, 1 jan. 2003.

DESSAUER, C. W. et al. International union of basic and clinical pharmacology. Cl. Structures and small molecule modulators of mammalian adenylyl cyclases. **Pharmacological Reviews**, v. 69, n. 2, p. 96–139, 2017.

DEVASANI, K.; YAO, Y. Expression and functions of adenylyl cyclases in the CNS. **Fluids and Barriers of the CNS**, v. 19, n. 1, p. 1–18, 1 dez. 2022.

DICK, G. W. A. Zika virus. II. Pathogenicity and physical properties. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 46, n. 5, p. 521–534, 1952.

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

DIDIER, S. Adenylate Cyclases of Trypanosoma brucei, Environmental Sensors and Controllers of Host Innate Immune Response. **Pathogens**, v. 7, n. 2, 1 jun. 2018.

DUARTE, G. et al. **Infecção do vírus Zika em gestantes e microcefalia** *Revista Brasileira de Ginecologia e Obstetricia* Federacao Brasileira das Sociedades de Ginecologia e Obstetricia, , 2 ago. 2017. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28575919/>>. Acesso em: 4 jul. 2021

ERRANTE, P. et al. SINALIZALIZAÇÃO MEDIADA PELOS NUCLEOTÍDEOS ADENOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (AMPC) E GUANOSINA MONOFOSFATO CÍCLICO (GMPC) NO CÂNCER. **UNILUS Ensino e Pesquisa**, v. 15, n. 39, p. 131–141, 31 ago. 2018.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL. **Zika virus epidemic in the Americas: potential association with microcephaly and Guillain-Barré syndrome**. [s.l: s.n.].

EVRIPIOTI, A. A. et al. Phosphodiesterase-induced cAMP degradation restricts hepatitis B virus infection. **Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 374, n. 1773, 2019.

FAIZAN, M. I. et al. Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. **Intervirolgy**, v. 59, n. 3, p. 152–158, 1 fev. 2016.

FARQUHAR, M. J. et al. Protein Kinase A-Dependent Step(s) in Hepatitis C Virus Entry and Infectivity. **Journal of Virology**, v. 82, n. 17, p. 8797–8811, set. 2008.

FAUCI, A. S.; MORENS, D. M. Zika Virus in the Americas — Yet Another Arbovirus Threat. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 7, p. 601–604, 18 fev. 2016.

FAYE, O. et al. Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 1, p. 36, 2014.

FRANÇA, G. V. A. DE et al. 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 : revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 27, n. 2, p. e2017473, 2 jul. 2018.

GALLAGHER, D.; SMITH, N.; KIM, S. Structure of the class IV adenylyl cyclase

reveals a novel fold. **Journal of molecular biology**, v. 362, n. 1, p. 114–122, 2006.

GARCIA, L. P. Epidemia do Vírus Zika e Microcefalia no Brasil: Emergência, Evolução e Enfrentamento equipe. 2018.

GARLANDA, C. et al. The Interleukin-1 Family: Back to the Future. **Immunity**, v. 39, n. 6, p. 1003–1018, 2013.

GHOSH, M. et al. Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. **GLIA**, v. 60, n. 12, p. 1839–1859, dez. 2012a.

GHOSH, M. et al. Proinflammatory cytokine regulation of cyclic AMP-phosphodiesterase 4 signaling in microglia in vitro and following CNS injury. **GLIA**, v. 60, n. 12, p. 1839–1859, dez. 2012b.

GHOZZI, V. E. et al. ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly and p53. **Cell death & disease**, v. 8, n. 1, 2017.

GÖTZ, M.; HUTTNER, W. B. **The cell biology of neurogenesis** **Nature Reviews Molecular Cell Biology** Nature Publishing Group, , nov. 2005. Disponível em: <<https://www.nature.com/articles/nrm1739>>. Acesso em: 2 jul. 2021

GRUOL, D. L.; NELSON, T. E. Physiological and pathological roles of interleukin-6 in the central nervous system. **Molecular neurobiology**, v. 15, n. 3, p. 307–339, 1997.

HAMEL, R. et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal of Virology**, v. 89, n. 17, p. 8880–8896, 1 set. 2015.

HEUKELBACH, J. et al. Zika virus outbreak in Brazil. **Journal of Infection in Developing Countries**, v. 10, n. 2, p. 116–120, 1 fev. 2016.

HIGUCHI, T. et al. Polymorphism of the 5'-flanking region of the human tumor necrosis factor (TNF)- α gene in Japanese. **Tissue Antigens**, v. 51, n. 6, p. 605–612, 1 jun. 1998.

HOFER, M.; PHARMACOLOGY, I. C.-B. JOURNAL OF; 2016, UNDEFINED. Immunoinflammatory diseases of the central nervous system—the tale of two cytokines. **Wiley Online Library**, v. 173, n. 4, p. 716–728, 1 fev. 2015.

HOLTAN, S. et al. Growth modeling of the maternal cytokine milieu throughout normal pregnancy: macrophage-derived chemokine decreases as inflammation. **Journal of Immunology Research**, v. 2015, p. 11, 2015.

JOST, S.; IMMUNOL, M. A.-A. R.; 2013, UNDEFINED. Control of human viral infections by natural killer cells. **academia.edu**, [s.d.].

KAM, Y. W. et al. Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. **Journal of Infectious Diseases**, v. 216, n. 2, 2017.

KASZTELEWICZ, B. et al. Cytokine gene polymorphism associations with congenital cytomegalovirus infection and sensorineural hearing loss. **European Journal of**

Clinical Microbiology & Infectious Diseases 2017 **36:10**, v. 36, n. 10, p. 1811–1818, 13 maio 2017.

KEASEY, S. et al. Antibody Responses to Zika Virus Infections in Environments of Flavivirus Endemicity. **Clinical and vaccine immunology : CVI**, v. 24, n. 4, 1 abr. 2017.

KERUI, V. et al. Lipopolysaccharide-Induced Dephosphorylation of AMPK-Activated Protein Kinase Potentiates Inflammatory Injury via Repression of ULK1-Dependent Autophagy. **Frontiers in immunology**, v. 9, n. JUN, 25 jun. 2018.

KHOR, C. C. et al. Genome-wide association study identifies susceptibility loci for dengue shock syndrome at MICB and PLCE1. **Nature Genetics** 2011 **43:11**, v. 43, n. 11, p. 1139–1141, 16 out. 2011.

KINDBERG, E. et al. A Functional Toll-Like Receptor 3 Gene (TLR3) May Be a Risk Factor for Tick-borne Encephalitis Virus (TBEV) Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 203, n. 4, p. 523–528, 15 fev. 2011.

KUMAR, A.; GIRI, S.; KUMAR, A. 5-Aminoimidazole-4-carboxamide ribonucleoside-mediated adenosine monophosphate-activated protein kinase activation induces protective innate responses in bacterial endophthalmitis. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1815–1830, 1 dez. 2016a.

KUMAR, A.; GIRI, S.; KUMAR, A. AICAR-mediated AMPK activation induces protective innate responses in bacterial endophthalmitis. **Cellular microbiology**, v. 18, n. 12, p. 1815, 1 dez. 2016b.

KUNO, G.; CHANG, G. J. J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Archives of Virology**, v. 152, n. 4, p. 687–696, 3 abr. 2007.

LAERTE PINTO JUNIOR, V. et al. **Vírus Zika: Revisão para Clínicos Zika Virus: A Review to Clinicians**. [s.l.: s.n.]. Disponível em: <www.actamedicaportuguesa.com>. Acesso em: 3 jul. 2021.

LIANG, Q. et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. **Cell Stem Cell**, v. 19, n. 5, p. 663–671, 3 nov. 2016.

LILJA, A. et al. Expression of the IL-6 family cytokines in human brain tumors. **International journal of oncology**, v. 19, n. 3, p. 495–499, 2001.

LOPEZ-CASTEJON, G.; REVIEWS, D. B.-C. & GROWTH FACTOR; 2011, U. Understanding the mechanism of IL-1 β secretion. **Cytokine & Growth Factor Reviews**, v. 22, n. 4, p. 189–195, 2011.

LUM, F. M. et al. Immunological observations and transcriptomic analysis of trimester-specific full-term placentas from three Zika virus-infected women. **Clinical and Translational Immunology**, v. 8, n. 11, p. 1–15, 2019.

MACHADO, P. R. L. et al. Mecanismos de resposta imune às infecções. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 79, n. 6, p. 647–662, 2004.

MACIEL, I. J.; JÚNIOR, J. B. S.; MARTELLI, C. M. T. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. **Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology**, v. 37, n. 2, p. 111–130, 30 out. 2008.

MAIMONE, D.; GUAZZI, G. C.; ANNUNZIATA, P. IL-6 detection in multiple sclerosis brain. **Journal of the Neurological Sciences**, v. 146, n. 1, p. 59–65, 27 fev. 1997.

MANOLIO, T. A. Genomewide Association Studies and Assessment of the Risk of Disease. **New England Journal of Medicine**, v. 363, n. 2, p. 166–176, 8 jul. 2010.

MING, G. LI; SONG, H. **Adult Neurogenesis in the Mammalian Brain: Significant Answers and Significant Questions**NeuronNeuron, , 26 maio 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21609825/>>. Acesso em: 4 jul. 2021

MIRANDA-FILHO, D. B. et al. Initial Description of the Presumed Congenital Zika Syndrome. **American journal of public health**, v. 106, n. 4, p. 598–600, 1 abr. 2016.

MOREIRA, D. et al. AMP-activated Protein Kinase As a Target For Pathogens: Friends Or Foes? **Current drug targets**, v. 17, n. 8, p. 942–953, 10 maio 2016.

MORELLI, S. S. et al. The maternal immune system during pregnancy and its influence on fetal development. **Research and Reports in Biology**, v. 6, p. 171–189, 2015.

MORENO-FERNANDEZ, M. E. et al. Regulatory T cells control HIV replication in activated T cells through a cAMP-dependent mechanism. **Blood**, v. 117, n. 20, p. 5372–5380, 19 maio 2011.

MOSIMANN, B. et al. Maternal serum cytokines at 30–33 weeks in the prediction of preeclampsia. **Wiley Online Library**, v. 33, n. 9, p. 823–830, set. 2013.

MUSSO, D. et al. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, v. 21, n. 2, p. 359, 2015.

MUSSO, D.; CAO-LORMEAU, V. M.; GUBLER, D. J. **Zika virus: Following the path of dengue and chikungunya?**The LancetLancet Publishing Group, , 18 jul. 2015. Disponível em: <<http://ees.elsevier.com/thelancet/www.thelancet.com>>. Acesso em: 25 jun. 2021

NAVECA, F. G. et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 6, 2018.

NAYAK, T. K. et al. Regulation of Viral Replication, Apoptosis and Pro-Inflammatory Responses by 17-AAG during Chikungunya Virus Infection in Macrophages. **Viruses**, v. 9, n. 1, 1 jan. 2017.

NEM DE OLIVEIRA SOUZA, I. et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. **Science translational medicine**, v. 10, n. 444, jun. 2018.

NGUYEN, S. M. et al. Highly efficient maternal-fetal Zika virus transmission in pregnant rhesus macaques. **PLoS Pathogens**, v. 13, n. 5, 1 maio 2017.

NICASTRI, E. et al. Persistent detection of Zika virus RNA in semen for six months after symptom onset in a traveller returning from Haiti to Italy, February 2016. **Eurosurveillance**, v. 21, n. 32, 11 ago. 2016.

NUNES, M. L. et al. **Microcephaly and Zika virus: A clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil** *Jornal de Pediatria* Elsevier Editora Ltda, , 1 maio 2016.

OJHA, C. R. et al. **Complementary mechanisms potentially involved in the pathology of Zika virus** *Frontiers in Immunology* Frontiers Media S.A., , 15 out. 2018. Disponível em: <www.frontiersin.org>. Acesso em: 25 jun. 2021

OKAMOTO, T. et al. Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. **Viruses** **2017, Vol. 9, Page 243**, v. 9, n. 9, p. 243, 28 ago. 2017.

PARK, J. W. et al. Destabilization of TNF- α mRNA by rapamycin. **Biomolecules and Therapeutics**, v. 20, n. 1, p. 43–49, jan. 2012.

PASTAN, I.; PERLMAN, R. Cyclic adenosine monophosphate in bacteria. **Science**, v. 169, n. 3943, p. 339–344, 1970.

PATRIZIO, M. Tumor necrosis factor reduces cAMP production in rat microglia. **GLIA**, v. 48, n. 3, p. 241–249, 15 nov. 2004.

PENKOWA, M. et al. **Strongly compromised inflammatory response to brain injury in interleukin-6-deficient mice**. Disponível em: <[https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/\(SICI\)1098-1136\(19990215\)25:4%3C343::AID-GLIA4%3E3.0.CO;2-V](https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/(SICI)1098-1136(19990215)25:4%3C343::AID-GLIA4%3E3.0.CO;2-V)>. Acesso em: 20 set. 2022.

PETERSEN, L. R. et al. Zika Virus. **New England Journal of Medicine**, v. 374, n. 16, p. 1552–1563, 21 abr. 2016.

PETRÔNIO, C. N. V. et al. O Início da Epidemia do Zika Vírus e os seus Reflexos na Saúde Pública Nacional e Internacional. **Id on Line REVISTA DE PSICOLOGIA**, v. 12, n. 40, p. 1232–1235, 3 jun. 2018.

PINHEIRO, Y. G. A. et al. **EVENTOS MOLECULARES E FISIOPATOLOGIA DA INFECÇÃO POR ZIKA VÍRUS**. Disponível em: <<https://revista.iesgo.edu.br/ojs/index.php/CSEI/article/view/23/11>>. Acesso em: 3 jul. 2021.

POLAND, G. A. et al. Development of vaccines against Zika virus. **The Lancet Infectious Diseases**, v. 18, n. 7, p. e211–e219, 1 jul. 2018.

RABELO, K. et al. Placental Inflammation and Fetal Injury in a Rare Zika Case Associated With Guillain-Barré Syndrome and Abortion. **Frontiers in microbiology**, v. 9, n. MAY, 16 maio 2018.

RABELO, K. et al. Zika Induces Human Placental Damage and Inflammation. **Frontiers in immunology**, v. 11, 1 set. 2020.

REBOREDO, L. et al. Zika Virus Congenital Syndrome and MTOR gene variants: insights from a family of dizygotic twins. **Heliyon**, v. 7, n. 4, 1 abr. 2021.

REIJNDERS, I. F.; GMGJ MULDER, A.; KOSTER, M. P. Desenvolvimento e função placentária em mulheres com histórico de complicações relacionadas à placenta: uma revisão sistemática. **Acta Obstetricia et**, v. 97, n. 3, p. 248–257, 1 mar. 2018.

RODRIGUEZ-MORALES, A. J.; ESPINOZA-FLORES, L. A. Should we be worried about sexual transmission of Zika and other arboviruses? **International maritime health**, v. 68, n. 1, p. 68–69, 2017.

ROSS, K. M. et al. Patterns of peripheral cytokine expression during pregnancy in two cohorts and associations with inflammatory markers in cord blood. **Wiley Online Library**, v. 76, n. 5, p. 18, 1 nov. 2016.

ROSS, S.; IMMUNOLOGY, D. C.-A. REVIEW OF; 2018, U. Signaling and function of interleukin-2 in T lymphocytes. **Annual Review of Immunology**, v. 36, p. 411–433, 2018.

ROSSI, D. et al. Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. **Journal of Internal Medicine**, v. 285, n. 2, p. 215–222, 1 fev. 2018.

ROSSI, D. et al. Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. **Journal of Internal Medicine**, v. 285, n. 2, p. 215–222, 1 fev. 2019.

ROTHAN, H. A. et al. Zika Virus and the Metabolism of Neuronal Cells. **Molecular Neurobiology** 2018 **56:4**, v. 56, n. 4, p. 2551–2557, 24 jul. 2018.

ROTHAUG, M.; BECKER-PAULY, C.; ROSE-JOHN, S. The role of interleukin-6 signaling in nervous tissue. **undefined**, v. 1863, n. 6, p. 1218–1227, 1 jun. 2016.

SANABRA, C.; MENGOD, G. Neuroanatomical distribution and neurochemical characterization of cells expressing adenylyl cyclase isoforms in mouse and rat brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, v. 41, n. 1, p. 43–54, 1 jan. 2011.

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

SCHRIEFER, A.; CARVALHO, E. M. **Biomarcadores em Medicina Biomarcadores em Medicina Biomarcadores em Medicina Biomarcadores em Medicina Biomarkers in Medicine**. [s.l.: s.n.].

SHAFIT-ZAGARDO, B.; GRUBER, R. C.; DUBOIS, J. C. The role of TAM family receptors and ligands in the nervous system: From development to pathobiology. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 188, p. 97–117, 1 ago. 2018.

SHI, Y.; GAO, G. F. Structural Biology of the Zika Virus. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 42, n. 6, p. 443–456, 1 jun. 2017.

SILVA, L. B. et al. The Role of TNF- α as a Proinflammatory Cytokine in Pathological Processes. **The Open Dentistry Journal**, v. 13, n. 1, p. 332–338, 2019a.

SILVA, M. et al. Overview of Brazilian Requirements for Therapeutic Equivalence of

Orally Inhaled and Nasal Drug Products. **AAPS PharmSciTech**, v. 20, n. 6, p. 1–7, 2019b.

SIMAVLI, S. et al. Hepcidin, iron status, and inflammation variables among healthy pregnant women in the Turkish population. **Journal of Maternal-Fetal and Neonatal Medicine**, v. 27, n. 1, p. 75–79, jan. 2014.

SINGH, S. et al. AMP-Activated Protein Kinase Restricts Zika Virus Replication in Endothelial Cells by Potentiating Innate Antiviral Responses and Inhibiting Glycolysis. **Journal of immunology (Baltimore, Md. : 1950)**, v. 204, n. 7, p. 1810–1824, 1 abr. 2020.

SIRONI, M. et al. A Common Polymorphism in TLR3 Confers Natural Resistance to HIV-1 Infection. **The Journal of Immunology**, v. 188, n. 2, p. 818–823, 15 jan. 2012.

SONG, Q. et al. **The emerging roles of vacuolar-type ATPase-dependent Lysosomal acidification in neurodegenerative diseases** **Translational Neurodegeneration** BioMed Central Ltd., , 11 maio 2020. Disponível em: [</pmc/articles/PMC7212675/>](https://pmc/articles/PMC7212675/). Acesso em: 30 jun. 2021

SPENCE, T. et al. Maternal Serum Cytokine Concentrations in Healthy Pregnancy and Preeclampsia. **Journal of Pregnancy**, v. 2021, 2021.

STOKKELAND, L.; GISKEØDEGÅRD, G.; STRIDSKLEV, S. Padrões de citocinas séricas na primeira metade da gravidez. **Cytokine**, 2019.

STUDZIŃSKA, M. et al. Association of TLR3 L412F Polymorphism with Cytomegalovirus Infection in Children. **PLOS ONE**, v. 12, n. 1, p. e0169420, 1 jan. 2017.

SUBHA, M. et al. Decreased baroreflex sensitivity is linked to sympathovagal imbalance, low-grade inflammation, and oxidative stress in pregnancy-induced hypertension. **Clinical and Experimental Hypertension**, v. 38, n. 8, p. 666–672, 16 nov. 2016.

TABATA, T. et al. Zika virus targets different primary human placental cells, suggesting two routes for vertical transmission. **Cell Host Microbe**, v. 20, p. 155–166, 2016.

TANG, H. et al. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, v. 18, n. 5, p. 587–590, 5 maio 2016.

TAPPE, D. et al. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Medical Microbiology and Immunology**, v. 205, n. 3, p. 269–273, 1 jun. 2016.

TEIXEIRA, H. M. P. et al. Adenylyl cyclase type 9 gene polymorphisms are associated with asthma and allergy in Brazilian children. **Molecular Immunology**, v. 82, p. 137–145, 1 fev. 2017.

THARAKAN, B.; MANYAM, B. V. Botanical therapies in chronic fatigue. **Phytotherapy Research**, v. 20, n. 2, p. 91–95, 2006.

VALLADA FILHO, H. P.; SAMAIA, H. Esquizofrenia: aspectos genéticos e estudos

de fatores de risco. **Brazilian Journal of Psychiatry**, v. 22, n. suppl 1, p. 2–4, maio 2000.

VINHAES, C. L. et al. Newborns with Zika virus-associated microcephaly exhibit marked systemic inflammatory imbalance. **Journal of Infectious Diseases**, v. 222, n. 4, 2020.

WALSH, J. et al. Inflammasomes in the CNS. **nature.com**, [s.d.].

WANG, A. et al. Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. **Emerging Microbes & Infections**, v. 6, n. 3, p. e13, 2017.

WANG, Z. et al. Notch signaling facilitates hepatitis B virus covalently closed circular DNA transcription via cAMP response element-binding protein with E3 ubiquitin ligase-modulation. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 1 dez. 2019.

WARRINGTON, N. et al. The cyclic AMP pathway is a sex-specific modifier of glioma risk in type I neurofibromatosis patients. **Cancer research**, v. 75, n. 1, p. 16–21, 1 jan. 2015.

WERNER, H. et al. First-trimester intrauterine Zika virus infection and brain pathology: prenatal and postnatal neuroimaging findings. **Prenatal Diagnosis**, v. 36, n. 8, p. 785–789, 1 ago. 2016.

XAVIER-CARVALHO, C. et al. Association of rs1285933 single nucleotide polymorphism in CLEC5A gene with dengue severity and its functional effects. **Human Immunology**, v. 78, n. 10, p. 649–656, 1 out. 2017.

XIE, S. et al. Systematic analysis of gene expression alterations and clinical outcomes of adenylate cyclase-associated protein in cancer. **Oncotarget**, v. 8, n. 16, p. 27216–27239, 2017.

ZHANG, X. et al. Epigenetically regulated miR-449a enhances hepatitis B virus replication by targeting cAMP-responsive element binding protein 5 and modulating hepatocytes phenotype. **Scientific Reports 2016 6:1**, v. 6, n. 1, p. 1–13, 3 maio 2016.

ZONCU, R. et al. mTORC1 senses lysosomal amino acids through an inside-out mechanism that requires the vacuolar H⁺-ATPase. **Science**, v. 334, n. 6056, p. 678–683, 4 nov. 2011.