

**Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde**

**ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) EM GENES
CODIFICADORES DE TLRs E DE PROTEÍNAS DA ROTA DE ATIVAÇÃO
PROVOCADA POR TLRs, EM PACIENTES INFECTADOS COM ZIKA VÍRUS
COM MANIFESTAÇÕES NO SISTEMA NERVOSO**

por

Thaís Bárbara de Souza Silva

Belo Horizonte
2020

THAÍS BÁRBARA DE SOUZA SILVA

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) EM GENES
CODIFICADORES DE TLR5 E DE PROTEÍNAS DA ROTA DE ATIVAÇÃO
PROVOCADA POR TLR5, EM PACIENTES INFECTADOS COM ZIKA VÍRUS
COM MANIFESTAÇÕES NO SISTEMA NERVOSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática/ BCM-GB

Orientação: Dr. Marco Antônio da Silva Campos
Coorientação: Dra. Erna Geessien Kroon
Dr. Pedro Augusto Alves

Belo Horizonte
2020

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 1975

S381a
2020

Silva, Thaís Bárbara de Souza.

Análise de polimorfismos de nucleotídeo único (snps) em genes codificadores de ttrs e de proteínas da rota de ativação provocada por ttrs, em pacientes infectados com zika vírus com manifestações no sistema nervoso / Thaís Bárbara de Souza Silva – Belo Horizonte, 2020.

XV, 87 f.: il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 82 – 87

Dissertação – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática/ BCM-GB.

1. Zika virus, 2. Variação Fenotípica 3. SNP 4. Receptor 9 Toll-Like 5. TIRAP Título. II. Campos, Marco Antônio da Silva. III. Kroon, Erna Gessien; Alves, Pedro Augusto.

CDD – 22. ed. – 616.93

THAÍS BÁRBARA DE SOUZA SILVA

ANÁLISE DE POLIMORFISMOS DE NUCLEOTÍDEO ÚNICO (SNPS) EM GENES
CODIFICADORES DE TLR5 E DE PROTEÍNAS DA ROTA DE ATIVAÇÃO
PROVOCADA POR TLR5, EM PACIENTES INFECTADOS COM ZIKA VÍRUS
COM MANIFESTAÇÕES NO SISTEMA NERVOSO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática/BCM-GB

Banca Examinadora:

Prof. Dr. Marco Antônio da Silva Campos (IRR – FIOCRUZ MINAS) Presidente
Profa. Dra. Marcele Neves Rocha (IRR – FIOCRUZ MINAS) Titular
Profa. Dra. Maria Isabel Maldonado Coelho Guedes (UFMG) Titular
Profa. Dra. Sandra Grossi Gava (IRR – FIOCRUZ MINAS) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 19/02/2020.

“É preciso correr muito para ficar no mesmo lugar. Se você quer chegar a outro lugar, corra duas vezes mais”

- Lewis Carroll (Alice no País das Maravilhas)

AGRADECIMENTOS

Agradeço à Deus pela oportunidade de trabalhar com o que eu gosto e por ter colocado pessoas maravilhosas no meu caminho.

Aos meus pais pelo apoio, cuidado e incentivo. A minha irmã Karol pela compreensão e companheirismo. Ao Pedro por estar comigo nos momentos bons e ruins, com tanta paciência e amor. Vocês são minha base e maiores exemplos. Amo vocês!

Ao meu orientador Marco e coorientadores Erna e Pedro por todos os ensinamentos, dedicação, confiança e oportunidade de desenvolver esse projeto.

Aos colegas de laboratório do IDV que, cada um à sua maneira, me ensinaram tanto. Em especial agradeço aos amigos Andreza, Ana Fraiha, Bia, Gustavo, Sabryna e Natalinha por todas as comilanças e risadas. Vocês deixam meus dias mais animados e mais leves.

Às plataformas de PCR em Tempo Real e de Sequenciamento do Instituto René Rachou pelo auxílio no desenvolvimento das técnicas utilizadas no projeto.

Por fim, agradeço o suporte financeiro das agências: CNPq, Instituto René Rachou, DECIT, PAPES VI/FIOCRUZ PrPq – UFMG e FNDCT N° 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

RESUMO

A Zika é uma arbovirose causada pelo vírus Zika (ZIKV) que é transmitido por mosquitos do gênero *Aedes*. Até recentemente era considerado que o ZIKV causava infecções de evolução benignas e esporádicas em humanos na África e na Ásia, mas com a disseminação para outros locais, foi observado um aumento nas ocorrências de casos com complicações no sistema nervoso (SN), associados à infecção por ZIKV, como a síndrome de Guillain-Barré (SGB) e malformações congênitas graves em crianças e fetos de mulheres, que foram infectadas com o vírus durante a gravidez. Não está bem esclarecido o mecanismo de indução da resposta imune contra ZIKV. Uma hipótese levantada para os casos de manifestações neurológicas seriam fatores genéticos do hospedeiro. Os polimorfismos são alterações no genoma que podem ou não comprometer a função dos genes. Os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) são de grande importância, quando presentes em genes que atuam no sistema imune inato, podendo comprometer a atividade desses genes e, como consequência, a resposta do indivíduo às infecções. Ainda não está descrita a associação de SNPs na predisposição a manifestações graves nas infecções por ZIKV. O objetivo deste trabalho foi avaliar a presença de SNPs em DNA obtido de 16 amostras de LCR de crianças infectadas por ZIKV, que tiveram manifestações no SN. Os SNPs foram selecionados de acordo com a literatura e estão associados a genes codificadores de receptores do tipo Toll (TLR) e de proteínas que ativam a via de TLR. Os SNPs selecionados para o estudo foram: rs8177374 no gene de *tirap*, rs3775291 no gene de *tlr3* e rs179008 no gene de *tlr7*. Estes SNPs foram avaliados por ensaios com sonda TaqMan, utilizando-se qPCR. Foi encontrada uma alta frequência de alelos mutados nos genes de *tlr7* e de *tirap*. O SNP analisado para *tlr3* não foi encontrado nas 16 amostras. Com nossos resultados concluímos que os SNPs encontrados em *tlr7* e *tirap* podem estar envolvidos no desfecho mais grave dos pacientes estudados e que não foi encontrado SNP em *tlr3*.

Palavras-chave: ZIKV, polimorfismos, SNP, TLR, TIRAP.

ABSTRACT

Zika is an arboviruse caused by the Zika virus (ZIKV) that is transmitted by mosquitoes of the genus *Aedes*. Until recently, ZIKV was considered to cause benign and sporadic infections in humans in Africa and Asia, but with the spread to other locations, an increase in the occurrence of cases with complications in the nervous system (SN) associated with the ZIKV infection was observed, such as Guillain-Barré syndrome (GBS) and severe congenital malformations in children and fetuses of women who were infected with the ZIKV during pregnancy. The mechanism for inducing the immune response against ZIKV is not well understood. A hypothesis raised for cases of neurological manifestations would be genetic factors of the host. Polymorphisms are changes in the genome that may or may not compromise the function of genes. Single nucleotide polymorphisms (SNPs) are of great importance, when present in genes that act on the innate immune system, and can compromise the activity of these genes and, consequently, the individual's response to infections. The association of SNPs in the predisposition to severe manifestations in ZIKV infections is unknown. Our objective was to evaluate the presence of SNPs in DNA of 16 CSF samples from children infected with ZIKV, who had manifestations in SN. SNPs were selected according to the literature and are associated with genes encoding Toll-like receptors (TLR) and proteins that activate TLR pathway. The SNPs selected for the study were: rs8177374 in the *tirap* gene, rs3775291 in the *tlr3* gene and rs179008 in the *tlr7* gene. These were evaluated by tests with a TaqMan probe, using qPCR. A high frequency of mutated alleles was found in the *tlr7* and *tirap* genes. The SNP analyzed for *tlr3* was not found in the 16 samples. With our results we conclude that the SNPs found in *tlr7* and *tirap* may be involved in the most severe outcome of the studied patients and no SNP was found in *tlr3*.

Keywords: ZIKV, polymorphisms, SNP, TLR, TIRAP.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1. Distribuição dos flavivírus no mundo.** No mapa pode ser observado que a distribuição dos flavivírus é maior nas áreas tropicais e essa distribuição já alcança o hemisfério norte (Fonte: adaptado de Holbrook, 2017). _____ 18
- Figura 2. Esquema representativo da organização do genoma dos vírus da família *Flaviviridae* e do processamento da poliproteína.** O RNA do vírus é de cerca de 11 kb. No topo está o genoma viral com a representação das regiões codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais com as regiões 5' e 3'. Abaixo do genoma, estão indicadas as proteínas virais clivadas no processamento proteolítico. Os símbolos P, H e R indicam a localização dos domínios NS3 protease, RNA NS3 helicase e NS5 RdRP, respectivamente. Legenda: C – capsídeo, prM – precursor da membrana, M - membrana, E – envelope, NS – proteínas não-estruturais (Fonte: Adaptado de Simmonds et. al., 2017). _____ 19
- Figura 3. Ciclo de replicação do ZIKV.** Após a penetração do vírus na célula por ligação ao receptor celular, ocorre a fusão das membranas do endossomo com a membrana viral seguido do desnudamento. O RNA viral liberado é traduzido em uma poliproteína que é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. A replicação do RNA ocorre nas membranas intracelulares e a montagem das novas partículas virais ocorre no complexo de Golgi. Através de uma mudança de pH e clivagem por furina, as partículas virais são liberadas da célula (Fonte: adaptado de Simmonds, 2013). _____ 21
- Figura 4. Linha do tempo da dispersão de ZIKV de 1947-2016** (Fonte: WHO, 2016). 22
- Figura 5. Cladograma representativo das relações entre as linhagens de ZIKV.** O número de acesso, país de isolamento e ano estão exibidos na árvore. A escala indica 0,03 substituições/local. A árvore foi baseada na sequência completa de nucleotídeos NS5, construída a partir de um alinhamento múltiplo usando o Clustal ômega e Phylogeny.fr (Fonte: Saiz, 2016). _____ 23
- Figura 6. Série histórica de identificação da presença de ZIKV de 2013 a 2016.** Países com transmissão sexual não estão representados nesse mapa. Essas informações não permitem mensurar o risco de infecção nos países (Fonte: adaptado de WHO, 2019). _____ 25
- Figura 7. Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2018 e 2019** (Fonte: Ministério da Saúde, 2019) _____ 26
- Figura 8. Países com infecções por ZIKV transmitidas por mosquito** (Fonte: WHO, 2016). _____ 29
- Figura 9. Curva epidemiológica de infecções por ZIKV suspeitas e confirmadas e casos de síndrome de Guillain-Barré, Polinésia Francesa, 2013-2014, por semana epidemiológica.** Colunas em cor-de-rosa apresentam suspeitas de casos de zika vírus; colunas em vermelho representam a presença de casos diagnosticados com síndrome de Guillain-Barré (Fonte: Adaptado de Sejvar, 2018). _____ 31
- Figura 10. Casos suspeitos e confirmados de ZIKV, Dengue e Chikungunya, sobrepostos ao surto da síndrome de Guillain-Barré em 2016 em Salvador, Brasil (A) e Barranquilla, Colômbia (B)** (Fonte: Adaptado de Sejvar, 2018). _____ 32

Figura 11. Distribuição dos casos notificados e confirmados de síndrome congênita associada à infecção por ZIKV em nascidos vivos no Brasil em 2015-2016 (Fonte: Franca et al., 2018).	33
Figura 12. Principais sintomas da Zika. Todos os sintomas são de intensidade leve a moderada (Fonte: Ministério da Saúde, 2017).	34
Figura 13. Esquema representativo do perímetro cefálico em bebês sem e com microcefalia (Fonte: CDC,2019).	35
Figura 14. Receptores TLRs e seus respectivos ligantes (Fonte: adaptado de Skevaki, 2015).	39
Figura 15. Estrutura e localização dos TLRs em mamíferos. Nota-se que alguns TLRs estão localizados na membrana celular e outros na membrana do endossomo (Fonte: Abbas, 2012).	40
Figura 16. Vias de sinalização dos TLRs. Após a ligação, os domínios citoplasmáticos TIR dos TLRs recrutam os adaptadores de sinalização como, MyD88, TIRAP, TRAM e/ou TRIF. Dependendo da natureza do adaptador usado, várias quinases (IRAK4, IRAK1, IRAK2, TBK1 e IKK ϵ) e ubiquitina ligases (TRAF6 e pellino 1) são recrutadas e ativadas, culminando no envolvimento do NF- κ B, interferon tipo I, p38 MAP kinase (MAPK) e JNK MAPK. Os fatores transcricionais são transportados para o núcleo onde ativam/desativam a produção de fatores como citocinas e interferons (Fonte: adaptado de Lim, 2013).	42
Figura 17. Evasão do sistema imune mediada pelo ZIKV. Vias de sinalização que levam à indução de interferon tipo I (IFN) e genes estimulados por IFN (ISG) e a inibição de alguns pontos destas vias por diferentes proteínas não estruturais de ZIKV (Fonte: adaptado de Serman <i>et al.</i> , 2019).	49
Figura 18. Exemplos de polimorfismos no genoma humano. (A) Polimorfismo de inserção de elemento móvel, (B) Polimorfismo de microssatélite, (C) Variante de número de cópias e (D) Polimorfismo de inversão (Fonte: Nussbaum, 2008).	52
Figura 19. Exemplo de SNP. SNP a partir de um segmento do conjunto de referência do genoma humano demonstrado na parte superior. O SNP na posição 8 possui dois alelos, um com T (correspondente à sequência referência) e um com C (Fonte: Nussbaum, 2008).	52
Figura 20. Mapa do plasmídeo pGEM[®]-T Easy. (Fonte: https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf)	59
Figura 21. Metodologia de discriminação alélica com o uso de sondas TaqMan[®] (Fonte: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_040597.pdf)	62
Figura 22. Alinhamentos das sequências através do programa MEGA-X. As sequências foram avaliadas quanto a qualidade pelo programa Chromas e alinhadas no programa MEGA-X. Em (A) alinhamento da sequência da amostra 605 para o SNP rs3775291 no gene de <i>tlr3</i> , apresentando uma base normal C, (B) alinhamento da sequência da amostra 605 para o SNP rs179008 no gene de <i>tlr7</i> , apresentando uma base mutada T e (C) alinhamento da sequência das amostras 590 (a) apresentando uma base normal C e 591 (b) apresentando uma base mutada T para o SNP rs8177374 no gene de <i>tirap</i> (Fonte: dados do estudo).	64

Figura 23. Foto de gel de agarose com a digestão dos controles construídos. A digestão dos plasmídeos foi feita com a enzima de restrição EcoRI e analisado em gel de agarose 1,4%. Os fragmentos de DNA mostrados pela seta vermelha representam a banda do plasmídeo (\pm 2997 bp). Os fragmentos mostrados pelas setas verdes correspondem ao inserto de interesse que foi clonado no plasmídeo: TLR3 com 132 bp, TLR7 com 190 bp e TIRAP com 199 bp. Foram utilizados dois padrões de tamanho molecular. Na canaleta 1 está o padrão de tamanho molecular de 1Kb e na canaleta 6 está o padrão de tamanho molecular de 100 bp, sendo as amplificações esperadas demonstradas à esquerda (1 Kb) e à direita (100 bp) na imagem. Nas canaletas de 2 a 5 estão representados os controles de *tlr3* homocigoto normal, *tlr7* homocigoto mutado, *tirap* homocigoto normal e *tirap* homocigoto mutado, respectivamente. Legenda: bp = pares de base; Kb = Kilobases. (Fonte: dados do estudo) _____ 65

Figura 24. Genotipagem por discriminação alélica do SNP rs3775291 no gene de *tlr3* de DNA extraído de LCR de pacientes ZIKV positivos. O DNA de 16 pacientes foi empregado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs3775291 no gene de *tlr3*. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Qui Quadrado. Os controles estão representados por quadrados, sendo quadrados pretos controle negativo e em vermelho o controle homocigoto normal. As amostras estão representadas por círculos: círculos vermelhos representam amostras homocigotas normais e círculos verdes representam amostras heterocigotas. As formas que não estão preenchidas por cor (*with flags*) são amostras que tiveram algum problema na corrida como, diferentes genótipos em duplicatas. Os círculos em amarelo representam amostras que não tiveram amplificação (Fonte: dados do estudo). _____ 67

Figura 25. Intensidade de amplificação das sondas do SNP rs3775291 no gene de *tlr3*. No eixo X estão demonstrados os ciclos da qPCR. No eixo Y estão as intensidades das fluorescências (Fonte: dados do estudo). _____ 68

Figura 26. Genotipagem por discriminação alélica do SNP rs179008 no gene de *tlr7* de DNA extraído de LCR de pacientes ZIKV positivos. O DNA de 16 pacientes foi empregado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs179008 no gene de *tlr7*. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Qui Quadrado. Os controles estão representados por quadrados, sendo quadrados pretos o controle negativo e em azul controle homocigoto mutado. As amostras estão representadas por círculos: círculos vermelhos representam amostras homocigotas normais, círculo azul amostras homocigoto mutadas e círculos verdes representam amostras heterocigotas. As formas que não estão preenchidas por cor (*with flags*) são amostras que tiveram algum problema na corrida como, diferentes genótipos em duplicatas. Os círculos em amarelo representam amostras que não tiveram amplificação (Fonte: dados do estudo). _____ 70

Figura 27. Intensidade de amplificação das sondas do SNP rs179008 no gene de *tlr7*. No eixo X estão demonstrados os ciclos da qPCR. No eixo Y estão as intensidades das fluorescências (Fonte: dados do estudo). _____ 71

Figura 28. Genotipagem por discriminação alélica do SNP rs8177374 no gene de *tirap* de DNA extraído de LCR de pacientes ZIKV positivos. O DNA de 16 pacientes foi empregado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs8177374 no gene de *tirap*. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Qui Quadrado. Os controles estão representados por quadrados, sendo quadrados pretos os controles negativos, em vermelho os controles homocigoto normal, em azul os controles homocigotos mutados e

em verde os controles heterozigotos. As amostras estão representadas por círculos: círculos vermelhos representam amostras homozigoto normal, círculos azuis amostras homozigoto mutado e círculos verdes representam amostras heterozigotas. As formas que não estão preenchidas por cor (*with flags*) são amostras que tiveram algum problema na corrida como, diferentes genótipos em duplicatas. Os círculos em amarelo representam amostras que não tiveram amplificação (Fonte: Dados do estudo). _____ 73

Figura 29. Intensidade de amplificação das sondas do SNP rs8177374 no gene de *tirap*. No eixo X estão demonstrados os ciclos da qPCR. No eixo Y estão as intensidades das fluorescências (Fonte: dados do estudo). _____ 74

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sequências das sondas e primers TaqMan® _____	62
Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos usados para amplificar o DNA extraído de pacientes identificando os possíveis SNPs _____	63
Tabela 3 - Sequenciamento de amostras de LCR em geral, negativo para ZIKV, para construção dos controles _____	64
Tabela 4 - Análise estatística do ensaio de genotipagem para o SNP rs3775291 no gene de <i>tlr3</i> _____	66
Tabela 5 - Análise estatística do ensaio de genotipagem para o SNP rs179008 no gene de <i>tlr7</i> _____	69
Tabela 6 - Análise estatística de genotipagem para o SNP rs8177374 no gene de <i>tirap</i> _____	72
Tabela 7 - Resultado do sequenciamento de nucleotídeos do DNA amplificado na genotipagem por qPCR para o SNP rs8177374 no gene de <i>tirap</i> _____	75
Tabela 8 - Análise comparativa entre as frequências de polimorfismos de alelos obtidas neste estudo com o de banco de dados _____	76

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

µg - Micrograma

µL – Microlitro

BLAST - *Basic Local Alignment Search Tool*

C – Capsídeo

CERS - Centros Especializados de Reabilitação

CNV - Variantes do número de cópias

CpG - Motivos de citosina

DAMP - Padrão molecular associadas a danos

DC - Células dendríticas

DC-SIGN - *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*

DENV - *Dengue virus*

DNA – ácido desoxirribonucleico

DO – densidade óptica

dsRNA - Ácido ribonucleico de fita dupla

E – Envelope

ELISA – *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

FHEMIG - Fundação Hospitalar do Estado de Minas Gerais

GT - Gânglio trigêmeo

HCV - vírus da Hepatite C

HIJPII - Hospital Infantil João Paulo II

HIV - *Human immunodeficiency virus*

HSV - *Herpes simplex virus*

hTLRs – Receptores tipo *Toll* humano

ICB – Instituto de Ciências Biológicas

IFN - Interferon

IgM – Imunoglobulina M

IL – Interleucina

IPTG – Isopropil β-d-1-tiogalactopiranósido

ISTs - Infecções sexualmente transmissíveis

JEV - *Japanese encephalitis virus*

LB – Luria Bertani

LCR - Líquido cefalorraquidiano
LcrV - Antígeno V
LPS - Lipopolissacarídeo
LRR - Repetições ricas em leucina
LTA - Ácido lipoteicóico
M – molar
MAMP - Padrões moleculares associados a micróbios
MCP-1 – Proteína quimioatratadora de monócitos
MDA5 - Fator associado a diferenciação de melanoma 5
mg – Miligrama
mL – Mililitro
mM – Milimolar
mm³ – Milímetro cúbico
MMTV - Vírus do tumor mamário de camundongo
MyD88 - Fator de diferenciação mielóide 88
NCBI - *National Center for Biotechnology Information*
NF-κB - Fator nuclear κB
NLR - Receptores tipo NOD
OAS - Oligoadenilase sintetase
OMS - Organização Mundial de Saúde
ORN - Oligoribonucleotídeos sintéticos
PAMPs - Padrões moleculares associados a patógenos conservados
pb – pares de bases
PBS – *Phosphate buffered saline*
PCR - *Polymerase chain reaction*
PCR-RFLP - Polimorfismo de tamanho dos fragmentos de restrição
pDCs - Células dendríticas plasmocitóides
POWV - *Powassan virus*
prM – Precursor de membrana
PRR - Receptores de reconhecimento de padrões
qPCR - *Quantitative polymerase chain reaction*
RIG - *Retinoic acid-inducible gene-1-like*
RLR - Receptores tipo RIG
RNA – Ácido ribonucleico

RPM – Rotações por minuto

RSV - Vírus sincicial respiratório

RT-PCR – *Reverse-transcriptase polymerase chain reaction*

RT-qPCR – *Quantitative reverse-transcriptase polymerase chain reaction*

SGB - Síndrome de Guillain-Barré

SN – Sistema nervoso

SNP - Polimorfismos de nucleotídeo único

SNPdb – SNP database

ssRNA – Ácido ribonucleico de fita simples

TBEV - *Tick-borne encephalitis vírus*

TBEV - Vírus da encefalite transmitida por carrapatos

TIR - domínio receptor Toll/interleucina-1

TIRAP – domínio do receptor Mal ou Toll *interleukin-1* contendo proteína adaptadora

TLR - Receptores tipo *Toll*

TNG - Rede trans-Golgi

TRIF – *TIR-domain-containing adapter-inducing interferon- β*

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

WNV - *West Nile virus*

YFV - *Yellow fever virus*

ZIKV - *Zika vírus*

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
1.1. Zika vírus	17
1.2. Epidemiologia	21
1.3. Manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento	34
1.4. Resposta Imune	37
1.4.1. Receptores Tipo <i>Toll</i>	38
1.4.1.1. TLR1, TLR2 e TLR6	43
1.4.1.2. TLR3	44
1.4.1.3. TLR4	45
1.4.1.4. TLR7, TLR8 e TLR9	45
1.4.2. Resposta imune contra o ZIKV	46
1.5. Polimorfismos	50
2. OBJETIVOS	55
2.1. Objetivo Geral	55
2.2. Objetivos Específicos	55
3. METODOLOGIA	56
3.1. Escolha dos alvos	56
3.2. Amostras clínicas	57
3.3. Extração de DNA	57
3.4. Construção dos controles de genotipagem	58
3.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)	58
3.4.2. Clonagem dos fragmentos	58
3.4.3. Transformação bacteriana	59
3.4.4. PCR de colônia	60
3.4.5. Minipreparação de DNA plasmidial	60
3.4.6. Sequenciamento de nucleotídeos e análise	61
3.5. Genotipagem por qPCR	61
4. RESULTADOS	63
4.1. Construção dos vetores controles	63
4.2. Amostras clínicas	63
4.3. Identificação dos SNPs empregando método de genotipagem por qPCR	65
4.3.1. Identificação de SNP de <i>tlr3</i> rs3775291	65
4.3.2. Identificação de SNP de <i>tlr7</i> rs179008	69
4.3.3. Identificação de SNP de <i>tirap</i> rs8177374	72

4.3.4. Sequenciamento de nucleotídeos de DNA amplificado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs8177374 no gene de <i>tirap</i>	75
4.4. Correlação das Frequências	76
5. DISCUSSÃO	77
6. CONCLUSÃO	81
REFERÊNCIAS	82

1. INTRODUÇÃO

1.1. Zika vírus

O *Zika virus* (ZIKV) é um arbovírus pertencente à família *Flaviviridae*, membro do gênero *Flavivirus*. Essa família possui alguns dos patógenos virais humanos e animais amplamente distribuídos, principalmente nas regiões tropicais, e que causam morbidade e mortalidade em todo o mundo anualmente conforme apresentado na figura 1. Os membros mais proeminentes dessa família com epidemia, história, emergência/reemergência ou importância médica para os seres humanos incluem *Yellow fever virus* (YFV), *West Nile virus* (WNV), *Japanese encephalitis virus* (JEV), vírus da Hepatite C (HCV), *Dengue virus* (DENV), *Zika virus* (ZIKV), *Tick-borne encephalitis virus* (TBEV) e *Powassan virus* (POWV). Desses, a maioria é transmitida por artrópodes (arbovírus) como mosquitos e carrapatos hematófagos. A infecção por esses vírus pode resultar em várias doenças clínicas sintomáticas, variando de sintomas gripais autolimitantes não graves a sintomas graves e doenças potencialmente fatais, como encefalite e sequelas neurológicas (JEV, WNV, ZIKV, TBEV, POWV), icterícia, insuficiência renal e hepática (YFV), dano hepático e câncer (HCV) e febre hemorrágica (DENV) (WONG *et al.*, 2019). O ZIKV está relacionado ao DENV, apresentando sinais e sintomas semelhantes à essa arbovirose, que é uma das mais dispersas e importantes (SEJVAR, 2018).

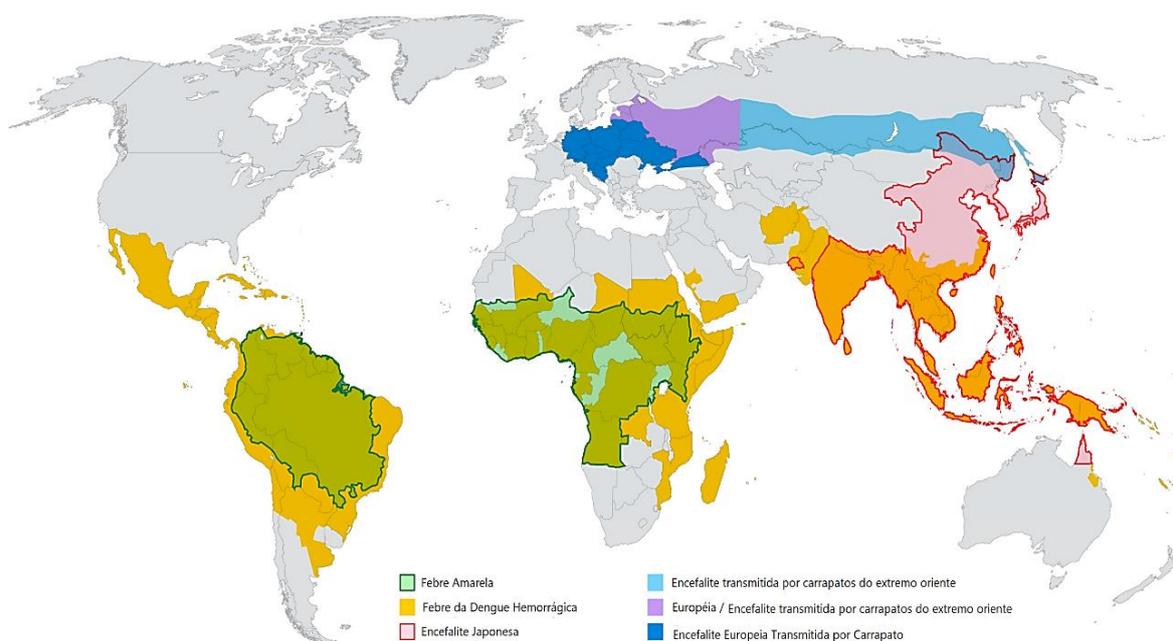


Figura 1. Distribuição dos flavivírus no mundo. No mapa pode ser observado que a distribuição dos flavivírus é maior nas áreas tropicais e essa distribuição já alcança o hemisfério norte (Fonte: adaptado de Holbrook, 2017).

O ZIKV possui um genoma de RNA de fita positiva de 11 kb, composto de uma ORF com 10794 pb de comprimento, flanqueado por duas regiões não codificantes. O vírus tem um capsídeo icosaédrico cercado por um envelope lipídico com um diâmetro de 40 a 70 nm. O genoma é traduzido em uma única poliproteína grande, que é subsequentemente clivada em três proteínas estruturais: envelope (E), precursor de membrana (prM) e capsídeo (C), bem como sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5), necessários para a replicação viral e montagem. A proteína do envelope está envolvida no reconhecimento do receptor na superfície da célula hospedeira e depois no processo de fusão entre o envelope viral e as membranas intracelulares. Proteínas virais são sintetizadas como parte de uma poliproteína que é co- e pós translacionalmente clivada por proteases virais e celulares. As proteínas estruturais estão contidas na porção N proximal desta poliproteína e as proteínas não estruturais no restante como demonstrado esquematicamente na figura 2 (SIMMONDS *et al.*, 2017).

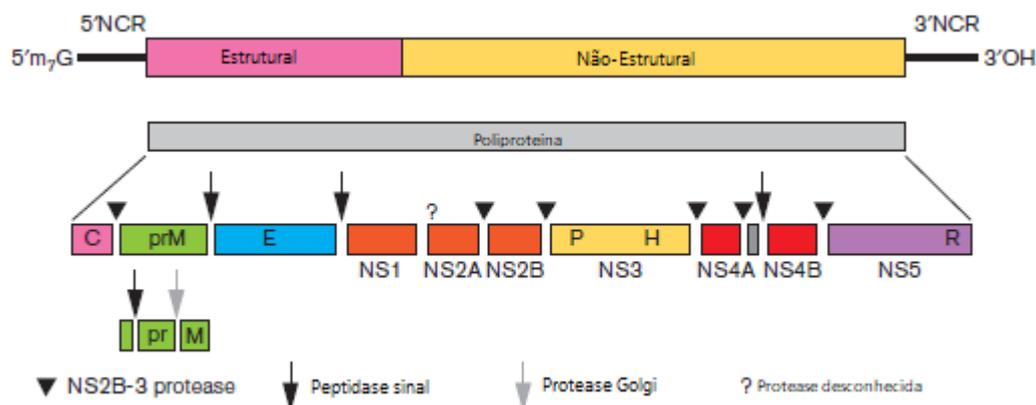


Figura 2. Esquema representativo da organização do genoma dos vírus da família *Flaviviridae* e do processamento da poliproteína. O RNA do vírus é de cerca de 11 kb. No topo está o genoma viral com a representação das regiões codificadoras de proteínas estruturais e não estruturais com as regiões 5' e 3'. Abaixo do genoma, estão indicadas as proteínas virais clivadas no processamento proteolítico. Os símbolos P, H e R indicam a localização dos domínios NS3 protease, RNA NS3 helicase e NS5 RdRP, respectivamente. Legenda: C – capsídeo, prM – precursor da membrana, M - membrana, E – envelope, NS – proteínas não-estruturais (Fonte: Adaptado de Simmonds et. al., 2017).

O ciclo de replicação do ZIKV está esquematizado na figura 3. O vírus se liga à superfície da célula hospedeira através de interações entre a proteína E e receptores celulares específicos (CHAMBERS *et al.*, 1990; KOSCHINSKI *et al.*, 2003). Após a adsorção, fusão e penetração do vírus através da membrana, o que ocorre através da endocitose mediada por receptor, a acidificação da vesícula endossomal desencadeia uma mudança conformacional na proteína E, levando à fusão das membranas viral e celular, o desnudamento da partícula viral e a liberação do nucleocapsídeo no citoplasma celular (KNIPE *et al.*, 2013; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). Uma vez liberado no citoplasma, o RNA é traduzido em uma única poliproteína, a qual é processada durante e após a tradução por proteases virais e do hospedeiro (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005).

Após a tradução e o processamento das proteínas virais, um sítio de replicação viral é montado a partir de proteínas não estruturais virais e fatores do hospedeiro. A replicação viral inicia-se com a síntese de um RNA intermediário, o qual serve como molde para a síntese do RNA genômico (KNIPE *et al.*, 2013). A replicação do genoma ocorre nas membranas intracelulares (KUHN *et al.*, 2002; MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). A morfogênese do vírus ocorre em associação com as membranas intracelulares (KNIPE *et al.*, 2013), a montagem do vírus ocorre na superfície do retículo endoplasmático, quando as proteínas estruturais e o recém-sintetizado RNA brotam do lúmen do retículo endoplasmático (KUHN *et al.*, 2002).

As partículas virais montadas nas vesículas possuem uma conformação de heterodímeros compostas pela proteína do envelope e pela pré-membrana, o que impede a atividade de fusão com a proteína E (KNIPE *et al.*, 2013). As partículas subvirais, virais imaturas e não infecciosas resultantes são transportadas para o complexo de Golgi através da rede trans-Golgi (TNG) (KUHN *et al.*, 2002), onde a acidificação induz mudanças conformacionais no vírus, expondo os sítios de clivagem da furina (SCREATON *et al.*, 2015). A seguir, as partículas virais imaturas são clivadas pela protease furina do hospedeiro, dando origem às partículas maduras infecciosas. As partículas subvirais também são clivadas pela furina (MUKHOPADHYAY *et al.*, 2005). Após a clivagem da pré-membrana no complexo de Golgi, ocorre a ativação da proteína de envelope e a fusão do vírus com a membrana plasmática (KNIPE *et al.*, 2013). Assim, as partículas virais maduras e as subvirais são liberadas por exocitose (KUHN *et al.*, 2002) (Figura 3).

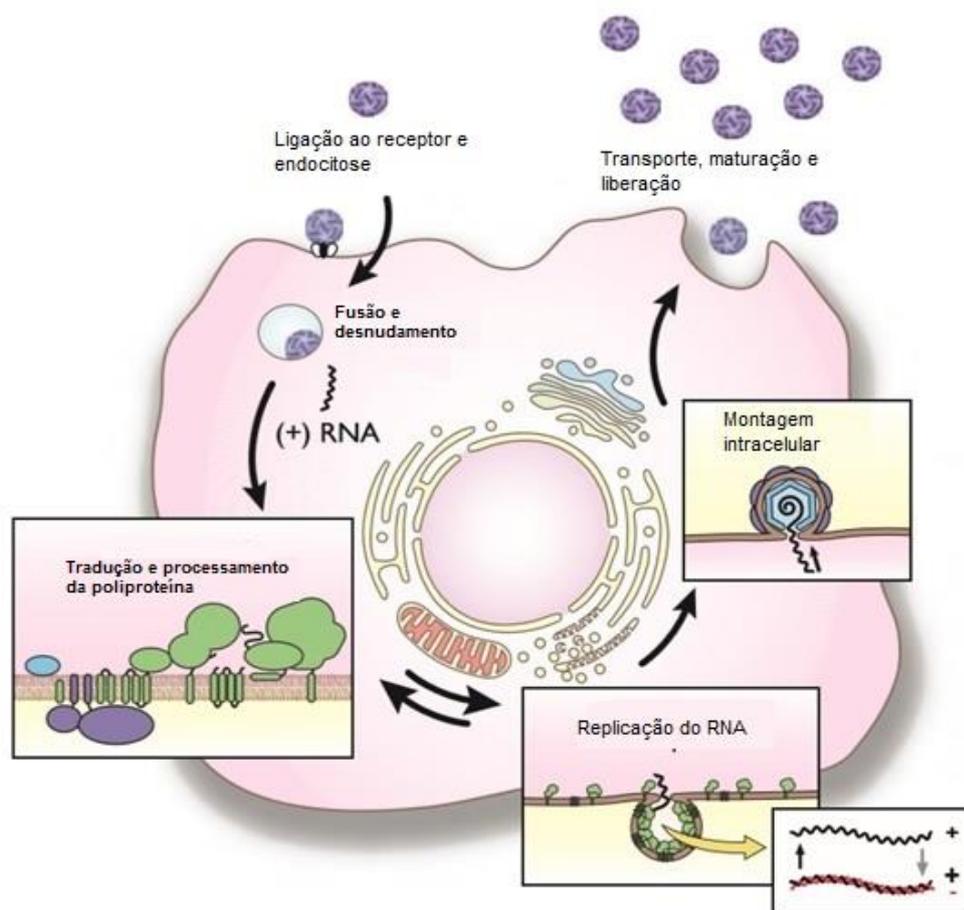


Figura 3. Ciclo de replicação do ZIKV. Após a penetração do vírus na célula por ligação ao receptor celular, ocorre a fusão das membranas do endossomo com a membrana viral seguido do desnudamento. O RNA viral liberado é traduzido em uma poliproteína que é clivada em proteínas estruturais e não estruturais. A replicação do RNA ocorre nas membranas intracelulares e a montagem das novas partículas virais ocorre no complexo de Golgi. Através de uma mudança de pH e clivagem por furina, as partículas virais são liberadas da célula (Fonte: adaptado de Simmonds, 2013).

1.2. Epidemiologia

O ZIKV foi primeiramente identificado na floresta de Zika em Uganda no ano de 1947, isolado de macacos *Rhesus*. O primeiro caso relatado em humanos foi no ano de 1952, em Uganda e na Tanzânia. Até o ano de 2007 casos esporádicos da doença foram relatados na África e alguns no sudeste da Ásia. A partir de então vários surtos foram documentados ao longo de ilhas do pacífico, demonstrando que a circulação do vírus atingira novas regiões (HAMEL *et al.*, 2016) (Figura 4).

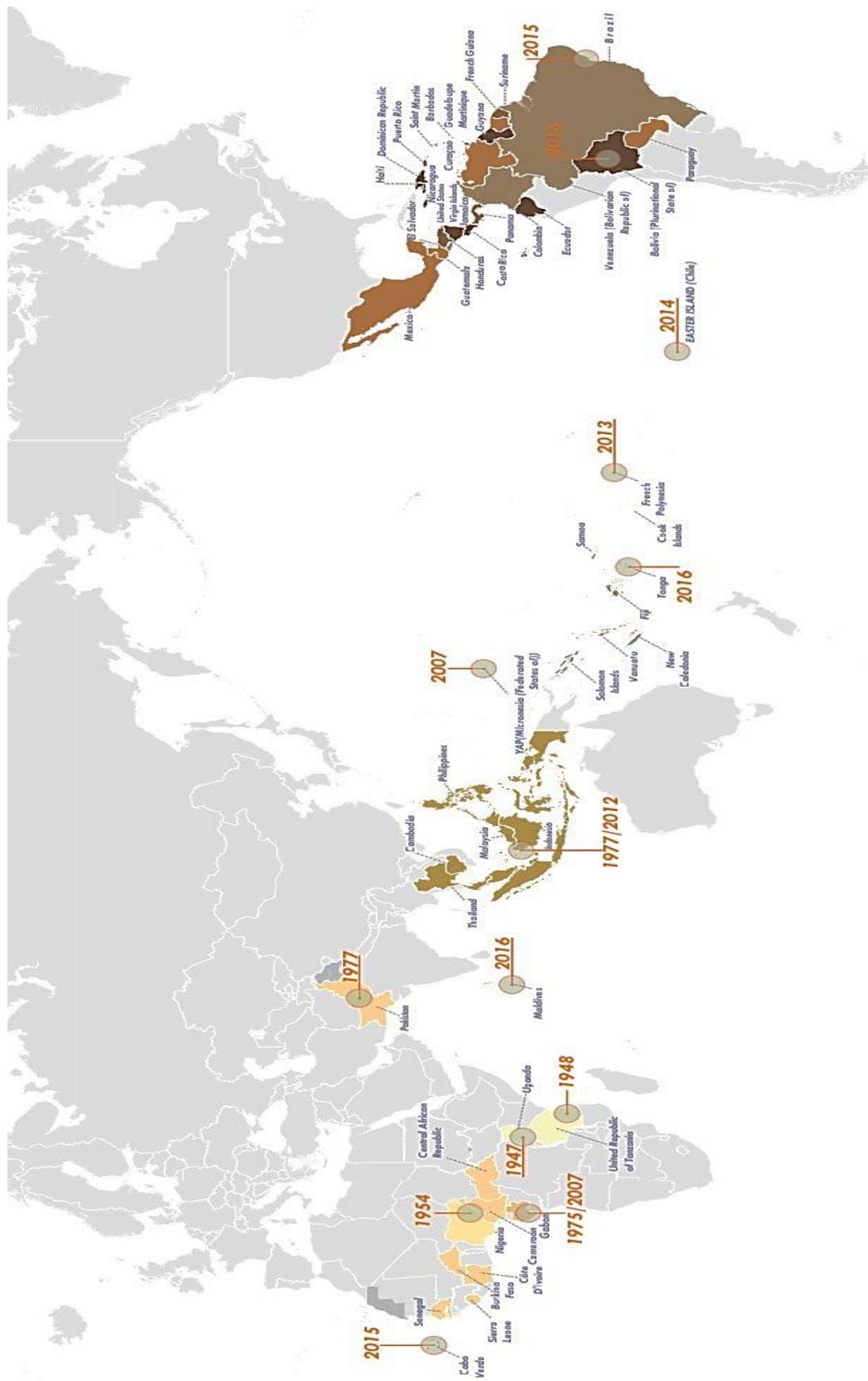


Figura 4. Linha do tempo da dispersão de ZIKV de 1947-2016 (Fonte: WHO, 2016).

O ZIKV é geneticamente e antigenicamente relacionado ao *Spondweni virus*. Ambos os vírus formam um clado único (clado X) dentro do cluster de flavivírus transmitidos por mosquitos. Análises filogenéticas revelaram a existência de duas linhagens principais: uma inclui as amostras africanas e a outra, as amostras asiática e americana (Figura 5). A linhagem africana é dividida em dois grupos, o cluster da África Oriental, contendo as variantes genéticas da estirpe prototípica MR766 isolada em Uganda, em 1947 e, um segundo grupo, incluindo cepas da África Ocidental. Estudos filogenéticos estabeleceram a data do surgimento do ZIKV na África oriental por volta de 1920. O mesmo estudo datou a transmissão do ZIKV do leste da África para a Ásia por volta de 1945, onde o vírus foi detectado no final dos anos 1960 na Malásia e, posteriormente, no sudeste da Ásia. Estes dados indicaram uma ocorrência generalizada de ZIKV da África para o sudeste da Ásia, oeste e norte da linha de Wallace, linha de fronteira que separa as regiões zoogeográficas da Ásia e da Australásia. Outros estudos confirmaram que as estirpes das Ilhas do Pacífico estão relacionadas com as linhagens asiáticas (GATHERER *et al.*, 2016).

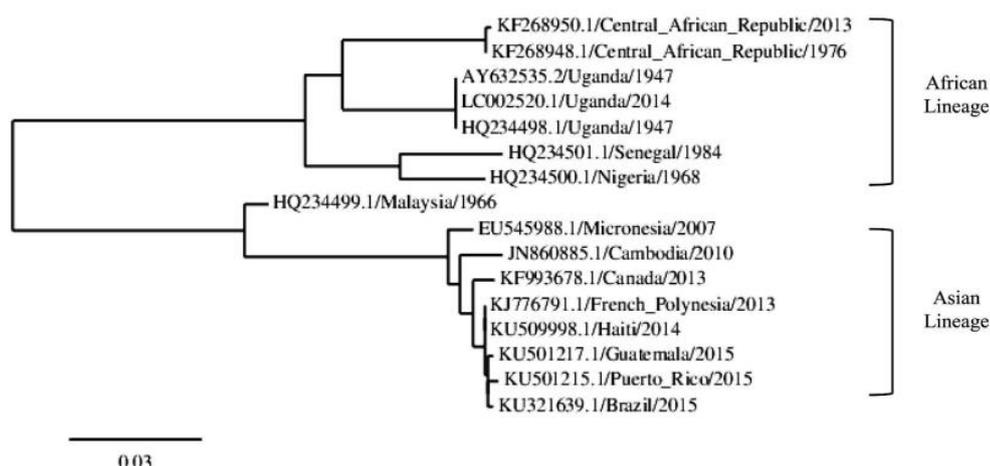


Figura 5. Cladograma representativo das relações entre as linhagens de ZIKV. O número de acesso, país de isolamento e ano estão exibidos na árvore. A escala indica 0,03 substituições/local. A árvore foi baseada na sequência completa de nucleotídeos NS5, construída a partir de um alinhamento múltiplo usando o Clustal ômega e Phylogeny.fr (Fonte: Saiz, 2016).

Devido às grandes distâncias geográficas envolvidas, parece provável que o vírus tenha sido introduzido nas Ilhas do Pacífico por um indivíduo na fase virêmica ou um mosquito infectado transportado para a ilha. Por outro lado, a transmissão recente para as Américas parece ter se originado nas Ilhas do Pacífico. A análise filogenética das sequências situou as linhagens brasileiras e americanas em um clado com sequências da linhagem asiática, mostrando uma

identidade de 99% com uma sequência de um isolado ZIKV da Polinésia Francesa (SAIZ *et al.*, 2016).

Em 2013, a epidemiologia do vírus mudou drasticamente. Primeiramente causando um surto na Polinésia Francesa, o ZIKV foi associado com a alta incidência de casos da síndrome de Guillain-Barré (SGB). Com a disseminação do vírus para a América do Sul, aumentaram os casos de doenças exantemáticas também associadas ao aumento significativo dos casos de SGB. Em adição, o vírus é capaz de induzir malformações congênitas graves em crianças e fetos de mulheres que foram infectadas com o vírus durante a gravidez. Essa situação levou a Organização Mundial de Saúde (OMS) a decretar em 2016, um estado de epidemia (SEJVAR, 2018).

O ZIKV identificado no norte do Brasil em 2015 foi 99% similar com a sequência da proteína do envelope viral dos vírus da Polinésia Francesa. Muito rapidamente, surtos de doenças exantemáticas foram identificados em vários locais no nordeste do Brasil. Logo o vírus havia se disseminado por grande parte do Brasil, e áreas com grandes surtos de ZIKV começaram a ter altas taxas de SGB, semelhantes ao surto na Polinésia Francesa. Em dezembro de 2017, 440.000 a 1.300.000 infecções por ZIKV foram estimadas no Brasil. Além disso, surtos contínuos foram identificados em vários países da América do Sul e da América Central e Caribe (SEJVAR, 2018) (Figura 6).

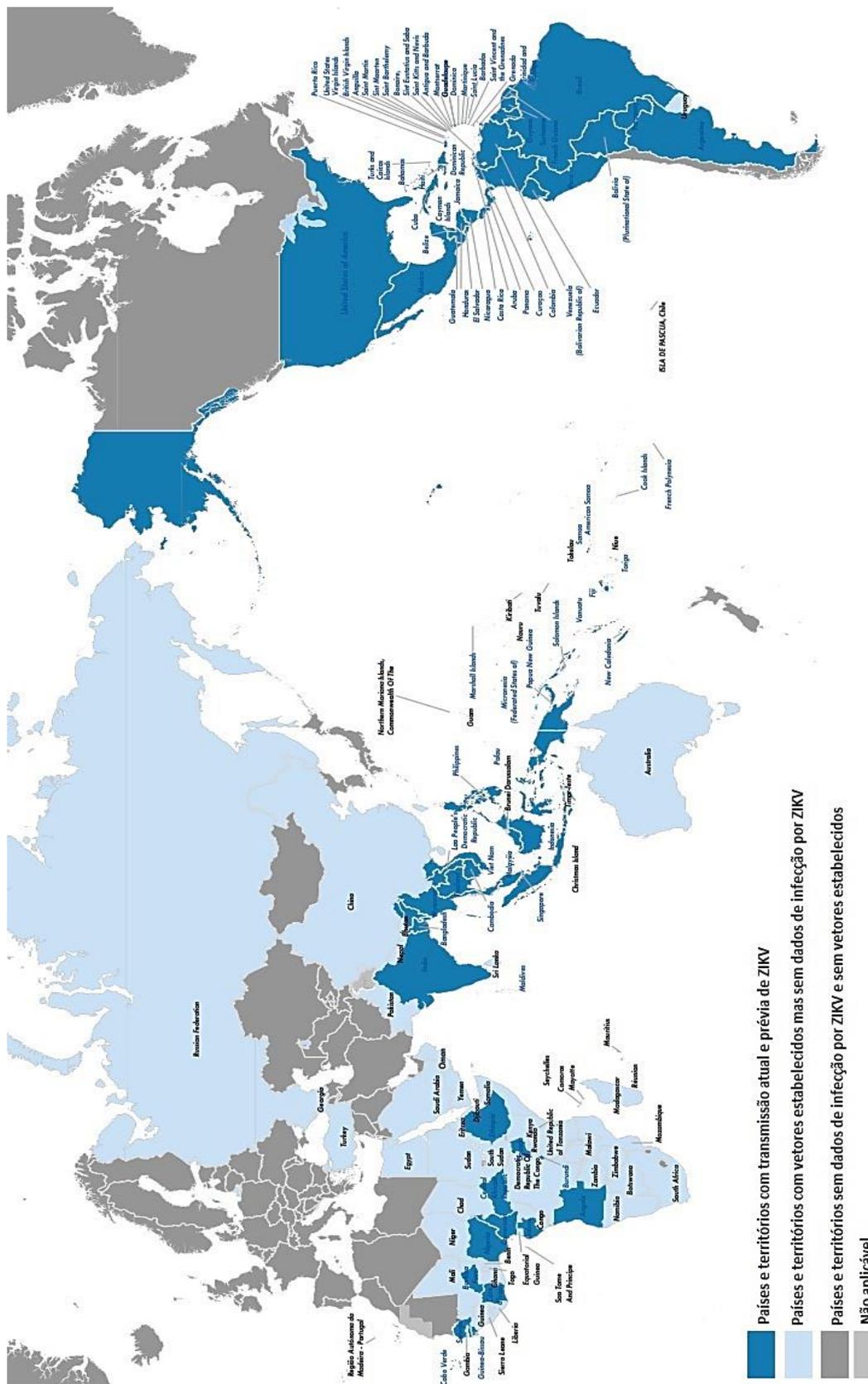


Figura 6. Série histórica de identificação da presença de ZIKV de 2013 a 2016. Países com transmissão sexual não estão representados nesse mapa. Essas informações não permitem mensurar o risco de infecção nos países (Fonte: adaptado de WHO, 2019).

Supõe-se que dois eventos podem ter levado à introdução do ZIKV no Brasil, a Copa do Mundo da FIFA de 2014 e um evento internacional de canoagem ocorrido no Rio de Janeiro entre 12 e 17 de agosto de 2014 onde grande parte dos canoístas eram representantes de os países do Pacífico. Aparentemente esse segundo evento parece ser a rota de introdução mais provável. (SAIZ *et al.*, 2016). Alternativamente, a introdução poderia ter ocorrido durante a Copa das Confederações de 2013 (15 a 30 de junho de 2013). Embora as datas do relógio molecular sejam mais consistentes com o torneio da Copa das Confederações, esse evento terminou antes que os casos de ZIKV fossem relatados pela primeira vez na Polinésia Francesa (FARIA *et al.*, 2016)

Em 20 de abril de 2018, mais de 95 países das Américas, África, Ásia, Caribe e Ilhas do Pacífico tiveram evidências de transmissão do ZIKV ou um alto risco de transmissão de ZIKV. De acordo com o Boletim Epidemiológico de setembro/2019, foram registrados 9.813 casos prováveis de Zika no Brasil. No mesmo período de 2018, foram registrados 6.669 casos prováveis (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019) (Figura 7).

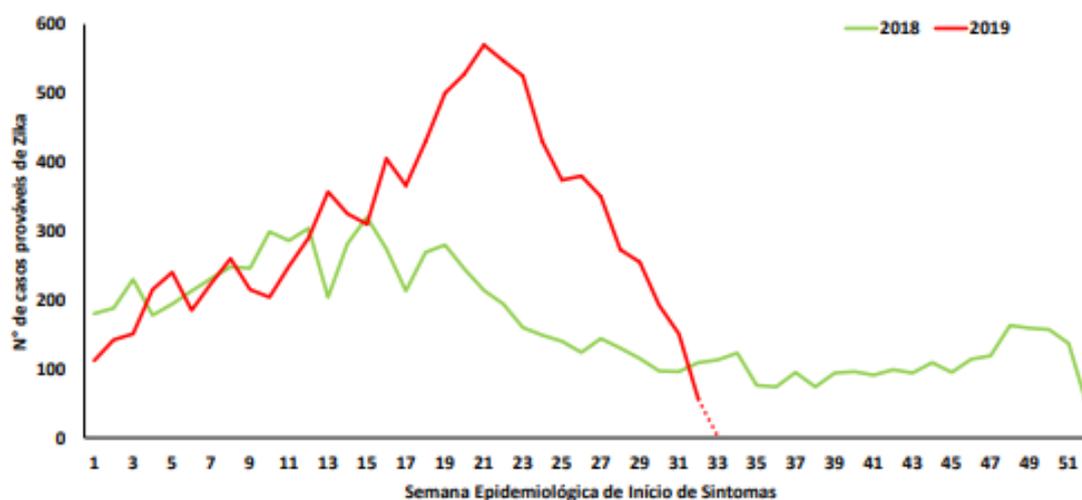


Figura 7. Casos prováveis de Zika, por semana epidemiológica de início de sintomas, Brasil, 2018 e 2019 (Fonte: Ministério da Saúde, 2019)

O ZIKV tem diferentes modos de transmissão. A picada do mosquito *Aedes* é a mais comum e envolve diferentes famílias de *Aedes*: *Ae. aegypti*, *Ae. albopictus*, *Ae. polynesiensis*, *Ae. vittatus*, *Ae. unilineatus* e *Ae. hensilli*, entre muitos outros subtipos. A transmissão vertical de uma mãe infectada através da placenta para o feto também foi relatada. Essa forma de transmissão pode ser

considerada a forma de transmissão que traz mais agravos sendo associada a casos de complicações neurológicas graves em fetos e recém-nascidos (AGUMADU *et al.*, 2018).

O ciclo começa quando um mosquito *Aedes* ingere sangue contendo o vírus após a picada em uma pessoa infectada na fase virêmica. O vírus começa a se multiplicar nas células epiteliais do intestino médio e vai para as glândulas salivares do mosquito. Após um período de incubação que dura em média de 8 a 10 dias, a saliva se torna infectante, tornando o mosquito um vetor para infectar um humano. Na gestação, o vírus pode atravessar a barreira sanguínea placentária para infectar o feto (AGUMADU *et al.*, 2018).

O vírus foi primeiramente isolado de *Ae. africanus* e desde então, o ZIKV foi isolado de *Ae. aegypti*, o principal vetor do vírus, e de *Ae. albopictus*, confirmando que ambas as espécies são vetores competentes. *Ae. aegypti* é atualmente distribuído na Ásia e na Oceania, nas Américas e em algumas regiões da África e da Europa (Madeira e nordeste do Mar Negro). No entanto, foi recentemente previsto que esta espécie poderá colonizar em breve algumas regiões do sul da Europa, bem como a América do Norte e a Austrália (KRAEMER *et al.*, 2015). Apesar da indiscutível origem evolutiva africana da ZIKV e sua identificação precoce na África há aproximadamente 70 anos atrás, a extensão da distribuição viral e a imunidade herdada nas populações africanas ainda permanecem desconhecidas. Um estudo de Nurtop *et al.*, demonstrou que a circulação do ZIKV na República do Congo é limitada, resultando em um baixo nível de imunidade específica na população. Estudos sobre a resposta imune desencadeada pelo ZIKV são de grande importância, visto os danos causados pela infecção e potencial epidêmico desse vírus (NURTOP *et al.*, 2020).

A primeira evidência do papel do *Ae. aegypti* no ciclo de transmissão urbana do ZIKV foi sugerida após o seu isolamento de um pool de mosquitos coletados em 1966 na Malásia. *Ae. albopictus*, o chamado mosquito tigre asiático, também é amplamente distribuído. Esta espécie está atualmente circulando na Ásia, América do Norte, Central e do Sul (KRAEMER *et al.*, 2015), norte da Austrália e em algumas áreas da África e sul da Europa, onde se espalhou nas últimas duas décadas para a França, Alemanha, Itália e Espanha (DYER, 2016).

Ao contrário do *Ae. aegypti*, o *Ae. albopictus* pode “hibernar” na forma de ovos e sobreviver em regiões de temperatura fria. Esta espécie também pode

transmitir eficientemente o vírus, como demonstrado durante o surto que ocorreu no Gabão em 2007, onde, dentre todos os hospedeiros, foi o único no qual o vírus foi detectado, confirmando que *Ae. albopictus* também pode desempenhar um papel importante na transmissão do ZIKV (GRARD *et al.*, 2014).

A capacidade do ZIKV de ser eficientemente transmitido por ambas as espécies de mosquito (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*) através de fêmeas que se alimentam da picada em seres humanos complica ainda mais seu controle e, portanto, o do ZIKV. Ambas as espécies crescem muito próximas das populações humanas, mas enquanto *Ae. aegypti* se alimenta quase que exclusivamente da picada em seres humanos durante o dia e tipicamente descansa dentro de casa, *Ae. albopictus* é geralmente exofágico e pica humanos e, também, animais domésticos e de criação, embora em algumas circunstâncias preferencialmente se alimente em humanos, confirmando que também pode ter um comportamento antropofílico semelhante a *Ae. aegypti*. Portanto, métodos de controle para uma espécie podem não ser precisos para controlar a outra. Além disso, quando as populações de *Ae. aegypti* são reduzidas, *Ae. albopictus* invasivo oportunista pode se mover rapidamente para a área (HIGGS, 2016).

Outras espécies, como *Ae. polynesiensis*, podem também contribuir com a transmissão do ZIKV, como foi o caso durante o surto de 2013–2014 na Polinésia Francesa (CAO-LORMEAU *et al.*, 2014). De fato, o ZIKV também foi isolado de, pelo menos, outras 15 espécies do gênero *Aedes* em diferentes regiões do mundo. Além disso, na região de Kédougou, no Senegal, o ZIKV também foi ampliado a partir de grupos de três espécies de mosquitos pertencentes a outros gêneros: *Anopheles coustani*, *Culex perfuscus* e *Mansonia unifellis*. Como em outras infecções por arbovírus, a hibernação de ovos local poderia ser um aspecto importante para a manutenção e disseminação do ZIKV. A detecção do vírus em um grupo de machos de *Ae. furcifer* em 2011 no Senegal, mesmo sem a coleta de fêmeas de *Ae. furcifer* infectadas, sugeriu fortemente que o ZIKV é transmitido verticalmente em insetos pelo menos nesta espécie, e que esta via de transmissão pode ser um importante mecanismo de manutenção local (DIALLO *et al.*, 2014). Embora a maioria dos dados tenham sido obtidos por análises de mosquitos naturalmente infectados pelo ZIKV, sua atual competência vetorial ainda precisa ser claramente estabelecida (SAIZ *et al.*, 2016) (Figura 8).

Embora a principal rota de transmissão do ZIKV seja através da picada de mosquitos, a transmissão sexual é possível. Existem alguns casos de transmissão sexual relatados na literatura. Em 2016 foram relatados vários casos de pacientes que se infectaram com o vírus após viagens para locais com alto risco de infecções por ZIKV e, após o retorno para seus países de residência, os parceiros desses pacientes apresentaram sintomas da doença. Os parceiros não haviam saído do país de residência e relataram ter tido relações sexuais com os pacientes. Além disso, foi detectado ZIKV no sêmen de um paciente da Polinésia Francesa que apresentava hematospérmia (ZAMANI *et al.*, 2017).

Enquanto a maioria dos casos de Zika relatados em humanos teve resolução benigna, durante a epidemia da Polinésia Francesa várias complicações neurológicas foram relatadas apresentando SGB. Durante o surto na Polinésia Francesa, um paciente que apresentou SGB foi diagnosticado com ZIKV. Após este primeiro caso, cerca de 72 casos de SGB foram relatados, com 40 pacientes sendo soropositivos para a presença do vírus e a ligação com a infecção pelo ZIKV foi apresentada (Figura 9). A incidência resultou em um aumento inesperado do SGB em 20 vezes. No entanto, a relação direta entre o vírus e o SGB precisa ser confirmada devido à co-circulação de DENV (sorotipos 1 e 3) e ZIKV durante este surto (HAMEL *et al.*, 2016).

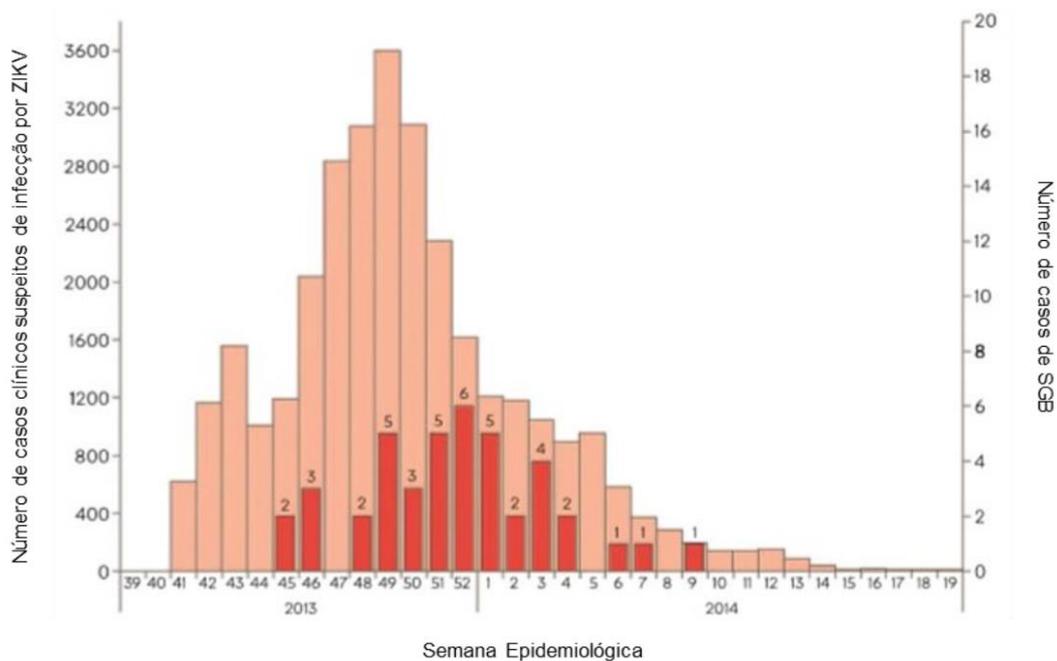


Figura 9. Curva epidemiológica de infecções por ZIKV suspeitas e confirmadas e casos de síndrome de Guillain-Barré, Polinésia Francesa, 2013-2014, por semana epidemiológica. Colunas em cor-de-rosa apresentam suspeitas de casos de zika vírus; colunas em vermelho representam a presença de casos diagnosticados com síndrome de Guillain-Barré (Fonte: Adaptado de Sejvar, 2018).

Durante o surto de 2016, houve um aumento considerável dos casos de SGB, não só no Brasil, mas também em outros países da América do Sul (Figura 10).

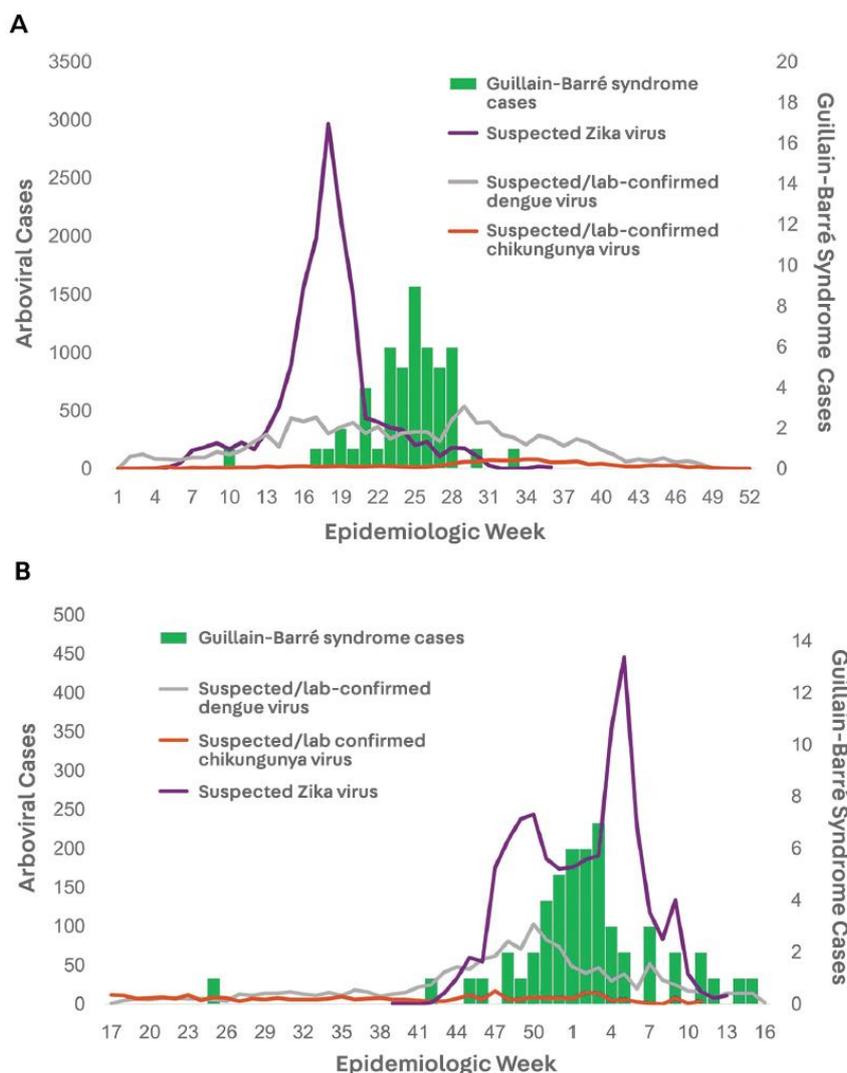


Figura 10. Casos suspeitos e confirmados de ZIKV, Dengue e Chikungunya, sobrepostos ao surto da síndrome de Guillain-Barré em 2016 em Salvador, Brasil (A) e Barranquilla, Colômbia (B) (Fonte: Adaptado de Sejvar, 2018).

Após o surto de 2015 no Brasil, a infecção por ZIKV foi associada a ocorrência de casos de complicações neurológicas graves principalmente em mulheres grávidas que apresentaram os sintomas da doença, fato que se tornou alvo de diversos estudos. As complicações do ZIKV em mulheres grávidas incluem microcefalia e outras malformações cerebrais no feto ou recém-nascido (AGUMADU *et al.*, 2018). A microcefalia congênita é caracterizada por uma circunferência da cabeça do feto abaixo da média para a idade gestacional, sendo a deficiência resultante mais comum o retardo intelectual e a incapacidade física. A incidência de microcefalia congênita no Brasil aumentou drasticamente de aproximadamente 150 casos por ano entre 2010 e 2015 para quase o dobro nos

primeiros 9 meses de 2015. Desde então, os casos dispararam para mais de 2000 em apenas alguns meses (FRANCA *et al.*, 2018) (Figura 11).

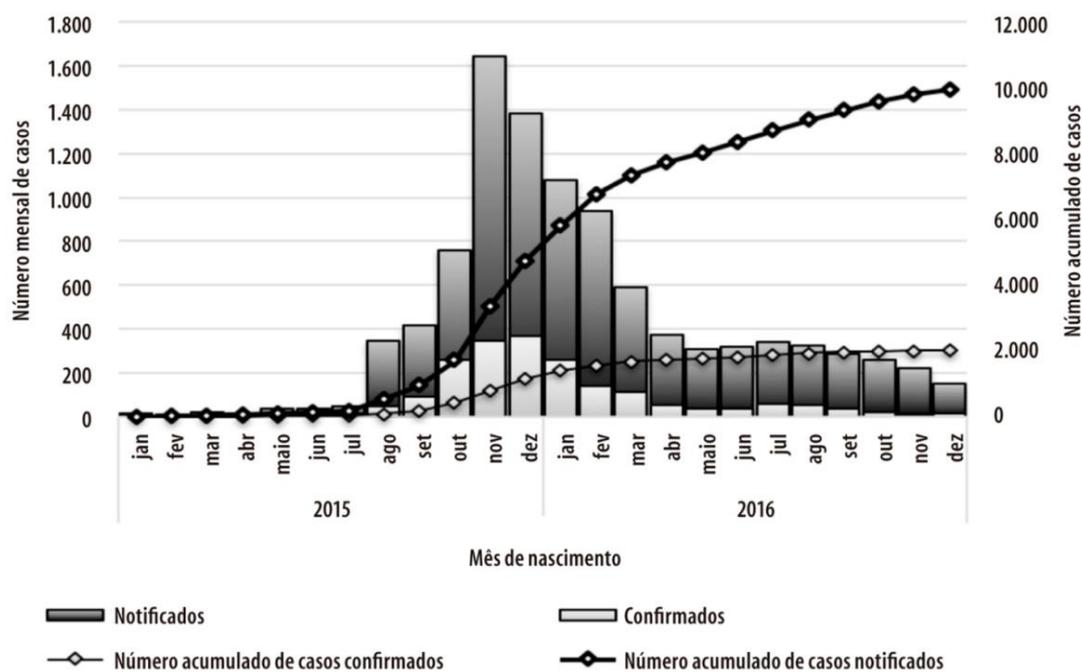


Figura 11. Distribuição dos casos notificados e confirmados de síndrome congênita associada à infecção por ZIKV em nascidos vivos no Brasil em 2015-2016 (Fonte: Franca *et al.*, 2018).

A capacidade de infecção transplacentária do ZIKV foi demonstrada pela presença de RNA viral no líquido amniótico de mulheres grávidas com microcefalia fetal (SUY *et al.*, 2016). Além da microcefalia, a possível relação entre infecção por ZIKV, hidropsia fetal e morte fetal foi relatada recentemente na mesma região. Todos esses dados sugerem uma possível transmissão materno-fetal. Embora a transmissão materno-fetal já tenha sido descrita em DENV e WNV, nenhum outro flavivírus era conhecido por ter efeitos teratogênicos. No entanto, a epidemia de microcefalia no Brasil também pode estar ligada a qualquer outra causa, como outros agentes infecciosos ou ambientais, bem como pode estar associada a um esforço das autoridades em saúde pública na notificação mais eficiente desses casos. Um estudo recente revelou algumas manifestações oculares em três crianças com microcefalia e uma apresentando atrofia neuro retiniana macular. No entanto, mais estudos são necessários para melhor definir os resultados da infecção pelo ZIKV durante a gravidez (VENTURA *et al.*, 2016).

Embora haja clara evidência de um aumento no número de casos de microcefalia no Brasil, tem sido sugerido que o número de casos suspeitos possa ser superestimado, devido ao diagnóstico baseado em testes de rastreamento de

baixa especificidade e a inclusão de crianças com cabeças pequenas que exigem uma aplicação mais rigorosa de técnicas antropométricas padronizadas e confirmação de casos suspeitos por exames laboratoriais ou evidência radiológica (HAMEL *et al.*, 2016).

1.3. Manifestações clínicas, diagnóstico e tratamento

As pessoas infectadas com o ZIKV podem não apresentar sintomas ou ter apenas sintomas leves. Os sintomas mais comuns são: febre, erupção cutânea, dor de cabeça, dor nas articulações, olhos vermelhos e dores musculares (Figura 12). Os sintomas podem durar de vários dias a uma semana (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2019).

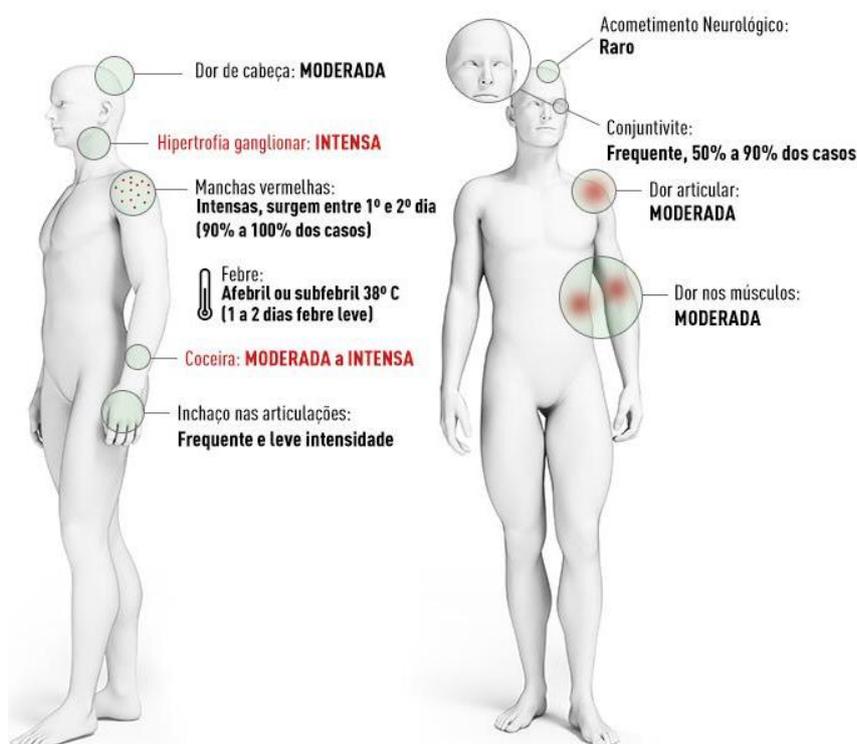


Figura 12. Principais sintomas da Zika. Todos os sintomas são de intensidade leve a moderada (Fonte: Ministério da Saúde, 2017).

A infecção pode apresentar consequências mais sérias, porém esse quadro não é tão comum. Complicações neurológicas, como mielite aguda, meningoencefalite e até perda auditiva, também foram documentadas (SHIRLEY *et al.*, 2017). O ZIKV pode danificar células do sistema nervoso central direta ou indiretamente (MARINHO *et al.*, 2019). Em adultos, a infecção pode causar a síndrome de Guillain-Barré (SGB) que é caracterizada por dores neuropática

lombar ou nas pernas, fraqueza progressiva e fraqueza facial, causada por desmielinização dos neurônios motores (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015).

Após o surto do Brasil em 2015, foi observado um aumento nos casos de malformações congênitas em bebês nascidos de mulheres que tiveram infecções por ZIKV, sintomatologia recém-descrita como síndrome congênita pelo ZIKV. Os sintomas clínicos que caracterizam essa síndrome podem ser divididos em morfológicos e funcionais. As anomalias funcionais estão associadas a um déficit neurológico e podem variar em gravidade. As alterações morfológicas incluem: anomalias do crânio, cérebro e olhos e contrações das articulações congênitas (TAHOTNA *et al.*, 2018).

A microcefalia é o sinal mais importante da síndrome congênita do zika. A microcefalia é um raro distúrbio neurológico no qual o cérebro da criança não se desenvolve completamente com isso, o tamanho da cabeça é menor do que o esperado (Figura 13). A criança com microcefalia geralmente tem diferentes graus de deficiência intelectual, assim, um pequeno percentual de crianças não terá nenhum tipo de atraso no desenvolvimento. As crianças com essa condição também pode ter um atraso na fala e nas funções motoras, nanismo ou baixa estatura, deficiência visual ou auditiva, e/ou outros problemas associados com anormalidades neurológicas (JOHNS HOPKINS UNIVERSITY).



Figura 13. Esquema representativo do perímetro cefálico em bebês sem e com microcefalia (Fonte: CDC,2019).

O diagnóstico errôneo da Zika é muito comum porque os sinais e sintomas em pacientes previamente saudáveis se assemelham às doenças causadas pelos *Chikungunya virus* e DENV (AGUMADU *et al.*, 2018). Além disso, não existe um teste padrão-ouro para identificação e os anticorpos produzidos pela infecção podem causar uma reação cruzada com outros arbovírus devido a suas similaridades (SAIZ *et al.*, 2016).

Os testes para diagnóstico incluem detecção molecular do RNA viral por RT-PCR e sorologia. O Centro de Controle de Doença e Prevenção (CDC) recomenda o teste do ZIKV em pacientes que tiveram recentemente exposição ao vírus e apresentaram sintomas recentes de Zika, mulheres grávidas com possível exposição ao vírus, gestantes assintomáticas atualmente expostas ao vírus, mulheres gestantes com possível exposição ao ZIKV tendo sido diagnosticada com possível infecção e em gestantes assintomáticas sem acompanhamento, mas com exposição recente ao ZIKV (AGUMADU *et al.*, 2018).

A escolha do teste a ser utilizado varia de acordo com os recursos disponíveis, mas ele deve ser considerado em pacientes que apresentam manifestações clínicas típicas da doença causada por ZIKV e com algum fator de risco epidemiológico como: residir ou viajar para áreas com risco de transmissão ou que possam ter sido infectadas por outras formas de infecção (sexual, por exemplo) (SHIRLEY *et al.*, 2017).

O RNA viral pode ser detectado no soro por cerca de 7 a 10 dias após o início dos sintomas. Anticorpos IgM contra ZIKV começam a aparecer 4 a 7 dias após o início da doença e podem persistir por aproximadamente 12 semanas. Os anticorpos neutralizantes, detectados por testes de neutralização de redução de placa (PRNTs), tornam-se detectáveis simultaneamente com IgM, mas podem persistir por anos. Para pacientes com doença sintomática, soro, sangue total e urina devem ser submetidos a testes moleculares assim que possível após o início dos sintomas, de preferência nos primeiros dias (LANDRY *et al.*, 2017).

A detecção do RNA viral no sangue, na urina e no líquido amniótico pode ser negativa ou transitória, apesar da comprovada infecção fetal. Por outro lado, o vírus pode ser detectado em mães grávidas ou em líquido amniótico sem anormalidades fetais. A sensibilidade, a especificidade e os valores preditivos negativos e positivos da detecção do RNA do ZIKV em fluidos amnióticos ainda são desconhecidos. Para bebês com possível infecção congênita pelo ZIKV, a RT-PCR deve ser realizada nos 2 primeiros dias de nascimento, tanto no soro quanto na urina, e o IgM ELISA deve ser realizado no soro. Testes de diagnóstico molecular e sorológico estão disponíveis comercialmente (BAUD *et al.*, 2017).

A Zika não possui tratamento específico e nem vacina, apenas tratamentos paliativos. Normalmente são indicados repouso, hidratação, antipiréticos e analgésicos. Como descrito para dengue, o uso de aspirina e anti-inflamatórios

não esteroidais deve ser evitado devido ao risco de aumento de sangramentos. Mesmo em casos mais leves é recomendada a consulta ao médico para conduta mais adequada e a automedicação deve ser evitada. No caso de sequelas mais graves, como doenças neurológicas, deve haver acompanhamento médico para avaliar o melhor tratamento a ser aplicado. As sequelas são tratadas em centros multiprofissionais especializados, como os Centros Especializados de Reabilitação (CERS) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Também é importante a adoção de medidas para se proteger da exposição ao sangue e aos fluidos corporais de pessoas contaminadas, principalmente no caso de mulheres grávidas. A visita a um membro da família ou amigo com Zika em um hospital deve ser acompanhada de cuidados de contato com o sangue e os fluidos corporais e a superfície com esses fluidos. Medidas preventivas como lavagem das mãos pré ou pós-contato com o paciente devem ser adotadas (CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC, 2019).

Como essa doença ainda não tem vacina, é de extrema importância que medidas de prevenção sejam tomadas. As formas de prevenção podem ser pessoais como o uso de telas protetoras, repelentes e medidas para prevenção de infecções sexualmente transmissíveis (ISTs), lembrando a importância de medidas pessoais em grávidas; prevenção domiciliar e comunitária como adoção de ações a fim de reduzir o número de mosquitos por meio da eliminação de criadouros, sempre que possível, ou manter os reservatórios e qualquer local que possa acumular água totalmente cobertos com telas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017)

1.4. Resposta Imune

O sistema imunológico natural bloqueia a entrada de microrganismos e elimina ou limita o seu crescimento. Os principais locais de interação entre o indivíduo e o meio ambiente são revestidos por epitélios contínuos que funcionam como barreiras físicas para impedir a entrada de agentes externos. Porém, caso esses agentes consigam atravessar essa barreira, deparam-se com as células do sistema imune (ABBAS *et al.*, 2012).

O sistema imune inato é responsável por grande parte do reconhecimento da presença de patógenos através de diversas estratégias. A imunidade inata evoluiu juntamente com os microrganismos de modo a proteger os seres multicelulares de infecções. A estratégia melhor caracterizada é através dos

receptores de reconhecimento de padrões (PRRs). Essa estratégia de reconhecimento de padrões baseia-se na detecção de um conjunto limitado de padrões moleculares associados a patógenos conservados (PAMPs) que são exclusivos do mundo microbiano e invariantes entre classes inteiras de patógenos (IWASAKI *et al.*, 2004). Esses receptores são capazes de detectar esses PAMPs, levando à indução de um sinal para as células que irão começar o combate a esse microrganismo (KNIPE *et al.*, 2013).

Os três principais PRRs são classificados em categorias: receptores tipo NOD (NLR), receptores tipo RIG (RLR) e receptores tipo Toll (TLRs). Entre os PRRs, os NLRs estão envolvidos na regulação de respostas inflamatórias e apoptóticas; os RLRs estão associados ao reconhecimento intracelular da replicação do RNA de vírus; e os elementos TLRs estão envolvidos em alarmar o sistema imunológico contra PAMPs extracelulares ou endossômicos, como lipopolissacarídeos bacterianos, ácido lipoteicóico, ácidos nucleicos dentre outros (VIDYA *et al.*, 2018). A detecção de patógenos virais pelo sistema imune inato tem duas consequências principais: em primeiro lugar, leva à indução dos mecanismos antivirais inatos, a maioria dos quais é mediada principalmente por interferon tipo I (IFNs). Em segundo lugar, leva à ativação da resposta imune adaptativa, que pode fornecer uma imunidade antiviral mais dirigida, antígeno-específica e duradoura (KNIPE *et al.*, 2013).

1.4.1. Receptores Tipo Toll

Alguns componentes do sistema imune inato dos mamíferos são muito similares àqueles existentes em plantas e insetos, sugerindo que seu aparecimento se deu em ancestrais comuns. Os receptores TLRs são proteínas que respondem à presença de microrganismos patogênicos através da ativação de mecanismos de defesa antimicrobianos nas células em que são expressos. Estruturas semelhantes são encontrados em todas as formas de vida, de insetos (receptores *Toll*) até mamíferos (receptores tipo *Toll*) (ABBAS *et al.*, 2012). Embora o número exato de genes possa diferir entre espécies, é provável que a maioria das espécies de vertebrados tenham de 10 a 15 TLRs (IWASAKI *et al.*, 2004).

Os TLRs pertencem à família PRRs. Eles reconhecem moléculas amplamente compartilhadas por patógenos coletivamente denominados PAMPs e

padrões moleculares associados a micróbios (MAMPS), esses geralmente expressos pela microbiota residente. Além disso, os TLRs reconhecem moléculas endógenas causadoras de danos nos tecidos e, conseqüentemente, são definidas como moléculas de padrão molecular associadas a danos (DAMPs) (HUG *et al.*, 2018). Os dez principais TLRs estão representados na figura 14.

Eles podem ser categorizados em dois tipos principais: aqueles que são expressos na superfície celular (TLR1, 2, 4, 5, 6, 11 e 12, considerando de humanos e de camundongos) e aqueles que são expressos nos endolisossomos (TLR3, 7, 8 e 9) (KNIPE *et al.*, 2013).

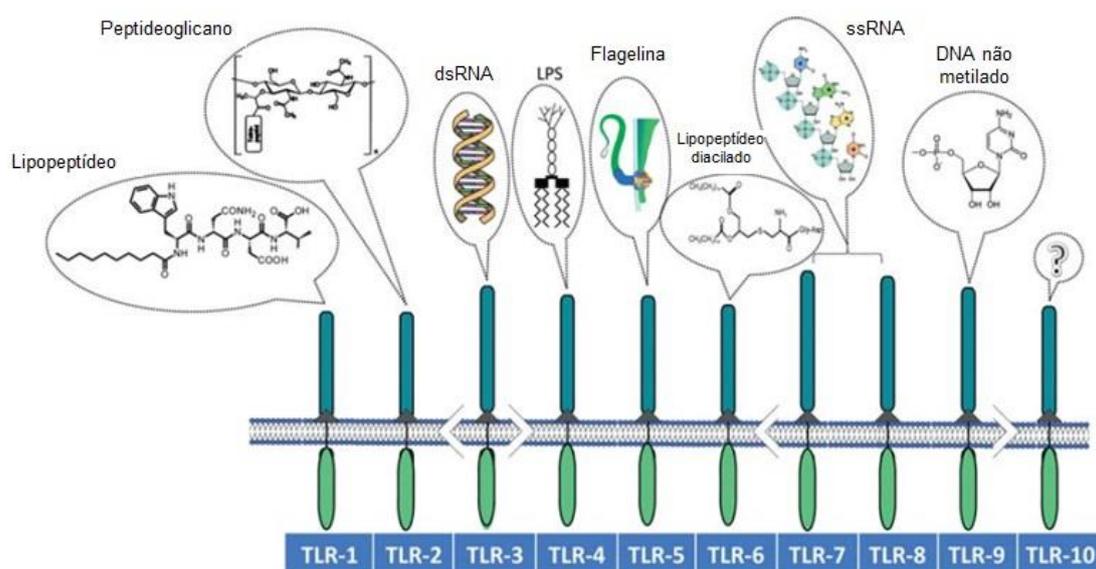


Figura 14. Receptores TLRs e seus respectivos ligantes (Fonte: adaptado de Skevaki, 2015).

A família de receptores dos TLRs é a classe mais bem caracterizada de PRRs, em vertebrados. JANEWAY (1989), na procura de receptores dentro do sistema imune inato, começou uma busca por proteínas relacionadas ao Toll de drosófilas. Estudos subsequentes forneceram uma análise detalhada das características estruturais que ligam essas proteínas de *Drosophila* à família de receptores de IL-1 e IL-18. Seus esforços forneceram dados importantes para o avanço na compreensão da imunidade inata. Eles identificaram o primeiro homólogo humano de Toll de drosófila, inicialmente denominado *Toll* Humano e posteriormente denominado receptor do tipo *Toll* 4. O TLR4 foi, portanto, um elo potencialmente importante entre a detecção de patógenos e a indução da resposta imune adaptativa. Era razoável imaginar que outros membros dessa família estariam presentes em células de mamíferos. Logo em seguida, mais quatro TLRs humanos (hTLRs) foram descobertos. ROCK *et al.* (1998) destacaram as

características estruturais gerais da família dos TLR, nomeadamente a presença de múltiplas repetições ricas em leucina extracelular e o domínio Toll homólogo encontrado na parte citoplasmática ou endossomal (domínio receptor Toll/interleucina 1, domínio TIR) de todos os membros desta família de proteínas (ADEREM *et al.*, 2000).

Todos os TLRs são proteínas transmembrana tipo I com domínios extracelulares ou intraendossômicos, contendo repetições ricas em leucina (LRR), que fazem a mediação do reconhecimento de PAMPs. Os domínios transmembranares dos TLRs ditam a localização do receptor, e o domínio citosólico contém o TIR, que se liga a proteínas adaptadoras e, em última análise, leva à expressão de uma variedade de genes (Figura 15).

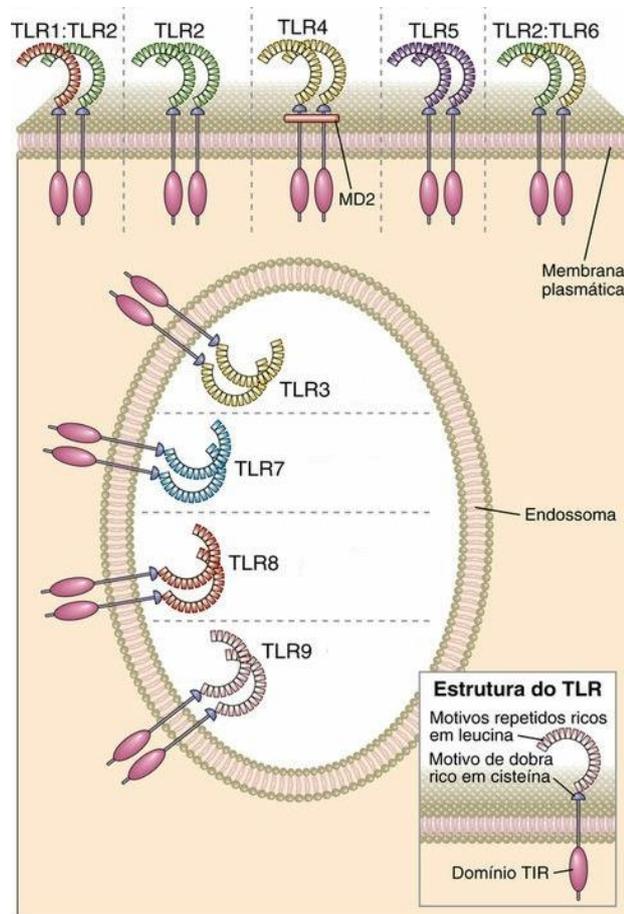


Figura 15. Estrutura e localização dos TLRs em mamíferos. Nota-se que alguns TLRs estão localizados na membrana celular e outros na membrana do endossoma (Fonte: Abbas, 2012).

O domínio TIR pode recrutar (após a ativação do TLR específico) diferentes adaptadores que são posteriormente responsáveis por uma resposta biológica específica. A via mais conhecida envolve o fator de diferenciação mielóide 88 (MyD88), uma molécula adaptadora composta por um domínio receptor da

interleucina-Toll-1 e um domínio de morte (MANSUR *et al.*, 2005). O MyD88 é utilizado por todos os TLRs, com exceção do TLR3. Essa molécula adaptadora é usada pelos membros da família TLR, desempenha um papel essencial na resistência e patogênese do hospedeiro durante a infecção por diferentes parasitas protozoários, como *Plasmodium berghei*, *T. cruzi*, *T. gondii* e *L. major* (CAMPOS *et al.*, 2001). O TRIF é recrutado para TLR3 e TLR4. Além disso, também são ativadas as vias pelas seguintes proteínas adaptadoras: TRIF, TIRAP/MAL e TRAM. O TRAM é recrutado seletivamente para o TLR4 e medeia a associação do TRIF-TLR4. Em vez disso, o TIRAP é um adaptador de classificação que faz a mediação do recrutamento de proteínas específicas para TLRs expressas nas membranas celular e intracelular (HUG *et al.*, 2018). Dependendo da proteína adaptadora, várias quinases (IRAK4, IRAK1, IRAK2, TBK1 e IKK1) e ligases de ubiquitina (TRAF6 e pellino 1) são recrutadas e ativadas, culminando no envolvimento do fator nuclear kB (NF-kB), interferon tipo I, P38 MAP quinase (MAPK) e JNK MAPK (LIM *et al.*, 2013) (Figura 16).

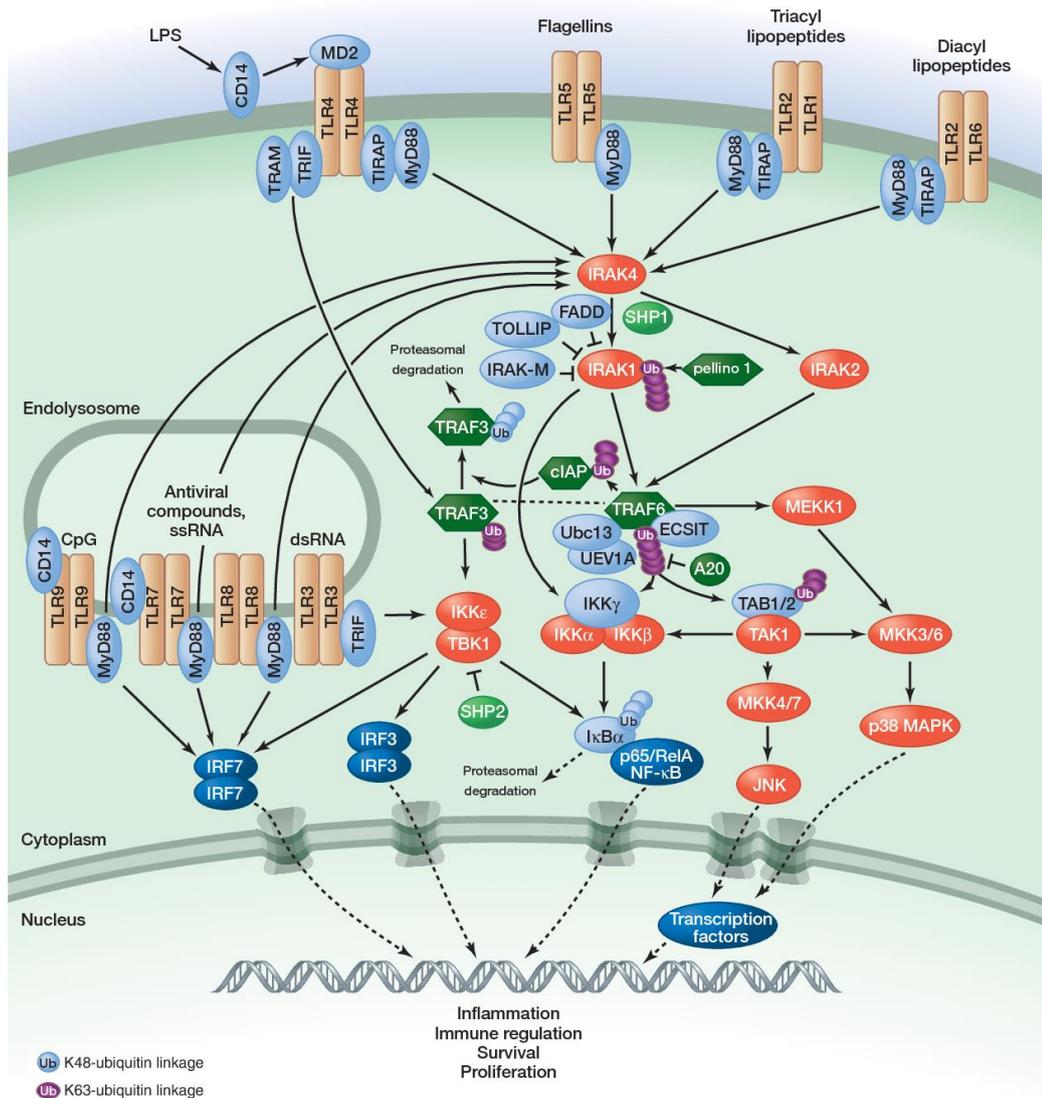


Figura 16. Vias de sinalização dos TLRs. Após a ligação, os domínios citoplasmáticos TIR dos TLRs recrutam os adaptadores de sinalização como, MyD88, TIRAP, TRAM e/ou TRIF. Dependendo da natureza do adaptador usado, várias quinases (IRAK4, IRAK1, IRAK2, TBK1 e IKKε) e ubiquitina ligases (TRAF6 e pellino 1) são recrutadas e ativadas, culminando no envolvimento do NF-κB, interferon tipo I, p38 MAP kinase (MAPK) e JNK MAPK. Os fatores transcripcionais são transportados para o núcleo onde ativam/desativam a produção de fatores como citocinas e interferons (Fonte: adaptado de Lim, 2013).

A detecção de vírus catalisa uma complexa cascata de sinalização que se bifurca em duas vias principais, culminando na síntese de citocinas pró-inflamatórias (dependentes de NF-κB) e citocinas antivirais, interferon tipo I (IFNs) (dependente de IRF). Além disso, a sinalização de TLR resulta na ativação das proteínas quinases ativadas por mitógeno (MAPKs). Os IFNs do tipo I, por sua vez, induzem uma bateria de genes que suprimem diretamente a replicação viral. Outras quimiocinas produzidas após a infecção, eficientemente recrutam células imunológicas para locais de infecção viral (VIDYA *et al.*, 2018).

A desregulação da cascata de sinalização TLR causa várias doenças humanas. Pacientes com deficiências herdadas de MyD88, IRAK4 ou TLR3 são suscetíveis a infecções bacterianas ou virais recorrentes (CASANOVA *et al.*, 2011). A ativação crônica de TLR7 e/ou TLR9 em células B autorreativas, por outro lado, está subjacente a doenças autoimunes sistêmicas (GEEN *et al.*, 2011). Além disso, mutações oncogênicas do MyD88 ocorrem frequentemente em um subtipo de células B ativado do tipo linfoma difuso de células B e em outras neoplasias malignas de células B (NGO *et al.*, 2011). Inibidores de vários TLRs ou suas quinases associadas estão atualmente sendo desenvolvidos para doenças autoimunes ou inflamatórias e são promissores no tratamento de doenças malignas de células B com mutações oncogênicas em MyD88 (LIM *et al.*, 2013). Também foi demonstrado que o *Herpes simplex vírus* (HSV-1) ativa TLR2 e TLR9 de maneira dependente de MyD88, sugerindo a importância dos TLRs no desenvolvimento de encefalites e resistência do hospedeiro a esta infecção viral (MANSUR *et al.*, 2005).

Outra grande importância dos TLRs é a sua capacidade de regular a proliferação e sobrevivência celular em uma variedade de contextos biológicos, inclusive na resposta imune, uma vez que ela deve ser capaz de expandir populações de células imunes e integrar respostas inflamatórias aos reparos de danos teciduais (SKEVAKI *et al.*, 2015).

1.4.1.1. TLR1, TLR2 e TLR6

O TLR2 reconhece uma gama estruturalmente diversa de PAMPs que incluem proteínas como o antígeno V (LcrV) de *Yersinia*, proteína hemaglutinina do vírus do sarampo, glicolipídios, ácido lipoteicoico (LTA) de *Staphylococcus aureus* e *Streptococcus pneumoniae*, lipopeptídeos ou lipoproteínas como MALP-2 e R-MALP das espécies de *Mycoplasma*, lipoproteínas de *Escherichia coli*, *Borrelia burgdorferi*, espécies de *Mycoplasma* e *Mycobacterium tuberculosis*, peptidoglicano de *S. aureus*, *S. pneumoniae* e *S. pyogenes* e polissacarídeo conhecido como zimosano de *Saccharomyces cerevisiae*. Além disso, o TLR2 também reconhece patógenos completos, incluindo as espécies da bactéria *Chlamydia*, vírus como HSV (vírus herpes simplex) e vírus varicela-zoster. A diversidade de reconhecimento de ligantes por TLR2 é possível porque TLR2

pode reconhecer os ligantes em associação com TLRs estruturalmente relacionados, como TLR1 e TLR6 (KUMAR *et al.*, 2009).

Os heterodímeros TLR2–TLR1 e TLR2–TLR6 reconhecem o triacillipeptídeo derivado de bactérias Gram-negativas e diacillipeptídeos derivados de micoplasma, respectivamente. TLR2 também reconhece o zimosano (β -1,3-glucano e β -1,6-glucano) em associação com a família de lectinas do tipo C estruturalmente não relacionadas conhecida como dectina-1. Além disso, o receptor CD36 demonstrou estar envolvido na fagocitose e produção de citocinas em resposta a *S. aureus* e seus componentes de parede celular como LTA e MALP-2, sugerindo que CD36 funciona como um co-receptor de TLR2 / 6. O TLR2 também reconhece GPI de *Trypanosoma cruzi* (CAMPOS *et al.*, 2001).

1.4.1.2. TLR3

O TLR3 reconhece RNA viral de cadeia dupla originado de vírus, como o reovírus. Também reconhece fitas duplas de RNA (dsRNA) produzido durante a replicação de vírus de RNA de fita simples, tais como WNV, vírus respiratório sincicial (RSV) e *Encephalomyocarditis virus* (EMCV) (VIDYA *et al.*, 2018). Ele é expresso por uma variedade de células em humanos e camundongos, incluindo células dendríticas (DCs) convencionais, células B, fibroblastos e células epiteliais, mas não em DC plasmocitóides (pDCs). Após o reconhecimento do PAMP, o TLR3 recruta TRIF através do seu domínio TIR. TRIF é responsável pela ativação de ambos NF- κ B e IRF3, levando a citocinas pró-inflamatórias e expressão do gene IFN tipo I, respectivamente. Para ativar os genes IFN tipo I, o TRIF recruta o TRAF3, que envolve o TBK1 e a subsequente ativação do IRF3. O IRF-3 transloca-se para o núcleo e liga-se aos promotores dos genes IFN tipo I. Os intermediários de dsRNA são produzidos durante o ciclo de replicação da maioria dos vírus de RNA (exceto para retrovírus). Os vírus de DNA também produzem dsRNA por transcrição convergente de seus genomas. Sabe-se há muito tempo que o dsRNA desencadeia a produção de IFN. O primeiro TLR implicado no reconhecimento do ácido nucléico viral foi o TLR3. O TLR3 responde ao agonista artificial do dsRNA, poli I: C, quando é fornecido extracelularmente. Entretanto, evidências que apoiam o reconhecimento mediado pelo TLR3 de intermediários de replicação viral autênticos permanecem elusivas, possivelmente devido à sobreposição de vias de reconhecimento que podem compensar a perda de TLR3.

O TLR3 pode estar envolvido no reconhecimento de dsRNA produzido por vírus no contexto de células apoptóticas fagocitadas. Humanos com mutações dominantes negativas no gene *tlr3* sofrem de infecção por herpes neonatal, indicando a importância deste receptor na proteção contra o HSV-1 no SNC (KNIPE *et al.*, 2013)

1.4.1.3. TLR4

O TLR4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS) de bactérias Gram-negativas, glicoinositolfosfolídeos de *Trypanosoma*, a proteína de fusão do vírus sincicial respiratório (RSV) e a proteína do envelope de vírus do tumor mamário de camundongo (MMTV). Também reconhece o diterpeno (taxol) purificado da casca de *Taxus brevifolia* (uma árvore nativa no Noroeste dos Estados Unidos). Além disso, reconhece direta ou indiretamente moléculas endógenas, como proteínas de choque térmico, fibrinogênio, ácido hialurônico, defensina β e domínio extracelular A em fibronectina. O reconhecimento do LPS é desencadeado por um complexo que contém TLR4, uma subunidade de reconhecimento MD2 (proteína de diferenciação mielóide-2) e CD14 ligado à membrana (glicosilfosfatidilinositol). A ativação de TLR4 é ainda apoiada por outra proteína conhecida como LBP (proteína de ligação a LPS). Os estudos mostram que o lipídio A (o componente ativo do LPS) se liga ao MD2 e forma um complexo. O complexo lipídico A – MD2 interage com o TLR4 e ativa a sinalização, sendo que o MD2 é importante no reconhecimento do lipídio A (VIDYA *et al.*, 2018).

1.4.1.4. TLR7, TLR8 e TLR9

Em humanos, o TLR7 é expresso em células dendríticas plasmocitóides e células B, enquanto o TLR8 é expresso por DC e monócitos mielóides. TLR7, 8 e 9 são todos expressos nos endossomos e compartilham vias de sinalização similares. Após o reconhecimento, esses receptores recrutam a molécula MyD88 através do domínio TIR. O MyD88, subsequentemente, interage com o domínio de várias proteínas IRAK para induzir a ativação de NF- κ B e IRF7. A IRAK4 é necessária para a ativação da via NF- κ B interagindo com TRAF6, que por sua vez ativa o complexo TAK1, levando à ativação das vias NF- κ B e MAPK. A ativação de NF- κ B segue o recrutamento de IRF5 para o complexo MyD88. Por outro lado, o MyD88 também recruta o IRF7, que forma um complexo de sinalização com

IRAK4 e TRAF6. O TRAF3 também se liga à MyD88 e IRAK1 para induzir a ativação de IRF7. Ao contrário de TLR3, TLR7 e 9 utilizam IRF7 e não IRF3 para ativação de genes IFN tipo I em pDCs. Curiosamente, em DCs convencionais, TLR7 e 9 utilizam MyD88 e IRF1 para induzir o IFN-I, mas não os genes do IFN- γ . O TLR7 e o TLR8 reconhecem fita simples de RNA (ssRNA) e induzem respostas imunes inatas aos vírus ssRNA (KNIPE *et al.*, 2013).

O TLR9 reconhece motivos de citosina (CpG) não metilados de ssDNA e induz citocinas inflamatórias e IFN tipo I. Estas sequências estão comumente presentes nos genomas de bactérias e vírus. Existem dois tipos estruturalmente distintos de DNAs CpG conhecidos, nomeadamente o tipo A (tipo D) e o tipo B (tipo K) (VIDYA *et al.*, 2018). A cooperação entre TLR2 e TLR9 no controle da infecção por HSV no gânglio trigêmeo (GT) e no cérebro de camundongos foi analisada por LIMA *et al.* (2010), demonstrando que TLR2 e, mais importante, TLR9 desempenham um papel na imunidade, respostas e controle imunológico no GT e no cérebro de camundongos. Essa cooperação também foi investigada por ZOLINI *et al.* (2014), demonstrando que macrófagos podem mediar a imunidade contra o *Herpes simplex vírus* (HSV-1) eficientemente, por óxido nítrico (iNOS) e que esse evento parece ser orquestrado inicialmente por TLR2 seguido de TLR9, com uma possível inter-relação entre esses dois receptores, contribuindo para o controle da infecção viral.

1.4.2. Resposta imune contra o ZIKV

O sistema interferon (IFN) é o mediador central da defesa do hospedeiro e o alvo do contra-ataque viral, enquanto interações complexas entre respostas de anticorpos e células T provavelmente determinam a resolução da infecção. O IFN tipo I é acionado poucas horas após a infecção viral, após o reconhecimento de vírus por PRRs, como os receptores do tipo I do gene induzível pelo ácido retinóico (RIG-I) (RL-I) e receptores do tipo *Toll* (NGONO *et al.*, 2018).

O ZIKV possui um amplo tropismo (pantropismo) celular *in vitro*, infectando células da pele humana, como fibroblastos dérmicos e queratinócitos epidérmicos; células mielóides humanas, tais como DCs e macrófagos; e células progenitoras humanas de origem neuronal, placentária e testicular (SERMAN *et al.*, 2019).

A maioria dos vírus pantrópicos emprega uma estratégia de disseminação semelhante. No local da inoculação, os vírions se multiplicam nos macrófagos

teciduais e nas células dendríticas, que direcionam o vírus para os linfonodos que drenam e para outros tecidos linfoides. Nos tecidos linfoides, muitos macrófagos são recrutados e amplificam o vírus. Após um período de viremia principalmente associada a células, o vírus se dissemina para monócitos, macrófagos ou células dendríticas em múltiplos tecidos. Os vírus reunidos se disseminam para infectar os demais tecidos locais (NGONO *et al.*, 2018).

Embora os estudos sobre tropismo do ZIKV até o momento sejam consistentes com esse modelo, muitas questões adicionais permanecem incertas, incluindo como o vírus atravessa epitélios intactos, penetra e persiste em fluidos corporais específicos e a possível influência de anticorpos pré-existentes para outros flavivírus no tropismo e, sendo assim, o conhecimento sobre a resposta celular à infecção por ZIKV ainda é escasso. No entanto, já foi descrito que o ZIKV penetra na célula usando fatores de adesão como o *Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin* (DC-SIGN) e diferentes membros da família de receptores de fosfatidilserina (HAMEL *et al.*, 2016).

Após a penetração na célula, as partículas virais são desnudadas e liberam o genoma viral no citoplasma, para o início da tradução e replicação do RNA viral. A multiplicação do ZIKV provoca uma resposta imune antiviral, induzindo a transcrição de TLR3, receptores do tipo I induzíveis pelo ácido retinóico (RIG-I) e fator associado a diferenciação de melanoma 5 (MDA5), assim como de outros genes estimulados por interferon, como oligoadenilase sintetase 2 (OAS2), estimulador de interferon (ISG15) e MX1, caracterizados por uma expressão do gene de IFN β reforçada (SAIZ *et al.*, 2016). O ZIKV é sensível ao IFN, já que um pré-tratamento de fibroblastos primários com IFN α , β e γ reduz a infecção por ZIKV. Também foi demonstrado que ZIKV regula a via de autofagia nos fibroblastos primários, o que é consistente com o que ocorre com outros flavivírus. Além disso, o aumento na expressão de IRF7 e IRF3 correlacionam com a forte indução de IFN α e β nos fibroblastos infectados por ZIKV. A expressão de quimiocinas inflamatórias, como CCL5, também é induzida durante a infecção por ZIKV, e a via do inflamassoma também é ativada após a infecção (HAMEL *et al.*, 2016).

Estudos recentes indicam que a conservação da sequência de aminoácidos e semelhanças estruturais entre os quatro sorotipos de DENV e ZIKV são substanciais o suficiente para que esses vírus sejam co-reativos tanto em níveis

celulares como humorais. A proteína E dos flavivírus é o alvo dos anticorpos neutralizantes nas infecções virais. Os pesquisadores também estão começando a explorar o papel das células T na imunidade ao ZIKV. As respostas das células T foram detectadas em primatas não humanos infectados pelo ZIKV e o pico de ativação correlaciona-se com a redução do RNA viral do ZIKV, sugerindo papéis protetores para ambas as células TCD4+ e TCD8+ no controle da replicação do ZIKV (NGONO *et al.*, 2018).

Estudos feitos em camundongos demonstraram que células TCD8+ apresentam marcadores de efeito citotóxico como CD107a e granzima B e exibem citotoxicidade *in vivo*. Durante a gravidez, os camundongos infectados com ZIKV tiveram uma diminuição na ativação de TCD8+, o que poderia favorecer a transmissão vertical do vírus. Também se notou que a resposta do TCD8+ ao ZIKV é similar à resposta anti DENV. Coletivamente, esses estudos elucidam as funções tanto de TCD8+ específico para o ZIKV quanto para a reação cruzada DENV/ZIKV em camundongos. Porém ainda são necessárias investigações futuras para elucidar o papel protetor das células TCD4+ e TCD8+ na resposta ao ZIKV (NGONO *et al.*, 2018).

A patogênese da microcefalia congênita associada à infecção pelo ZIKV durante a gravidez representa uma série complexa de eventos começando com infecção viral, subversão da imunidade do hospedeiro e tráfego através de múltiplas barreiras de tecido placentário e fetal (NELSON *et al.*, 2019).

Os flavivírus desenvolveram muitos mecanismos para antagonizar a infecção por IFN do tipo I do hospedeiro. Esses mecanismos incluem: (1) antagonismo direto da ativação de PRRs específicos; (2) sequestro de proteínas específicas estruturais que controlam a localização subcelular de PRRs; e (3) inibição de moléculas de sinalização *downstream* na via de indução de IFN. Estudos já demonstraram que a superexpressão de proteínas NS específicas do ZIKV inibe a ativação do promotor do IFN- β estimulada pela expressão ectópica do RIG-I 2CARD, que é constitutivamente ativo e/ou estimulado por agonistas do RIG-I nas células HEK293T. A NS4a reduziu a ativação do promotor de elementos de resposta estimulados por IFN (ISRE) e a secreção de IFN- β desencadeada por RIG-I 2CARD ou MDA5 superexpresso de maneira transiente, mas não por MAVS, TBK1 ou um mutante de IRF3 constitutivamente ativo (IRF3 / 5D) - sugerindo antagonismo no nível das RLRs. A expressão ectópica de NS4a reduziu a

interação de MDA5 ou RIG-I superexpressos com MAVS endógeno nas células HEK293T, sugerindo ligação competitiva como mecanismo de inibição de receptores tipo RIG (RLR) (Figura 17). Ainda são necessários maiores esclarecimentos sobre o mecanismo de evasão de RLR mediada por NS4a para o antagonismo do IFN na infecção por ZIKV (SERMAN *et al.*, 2019).

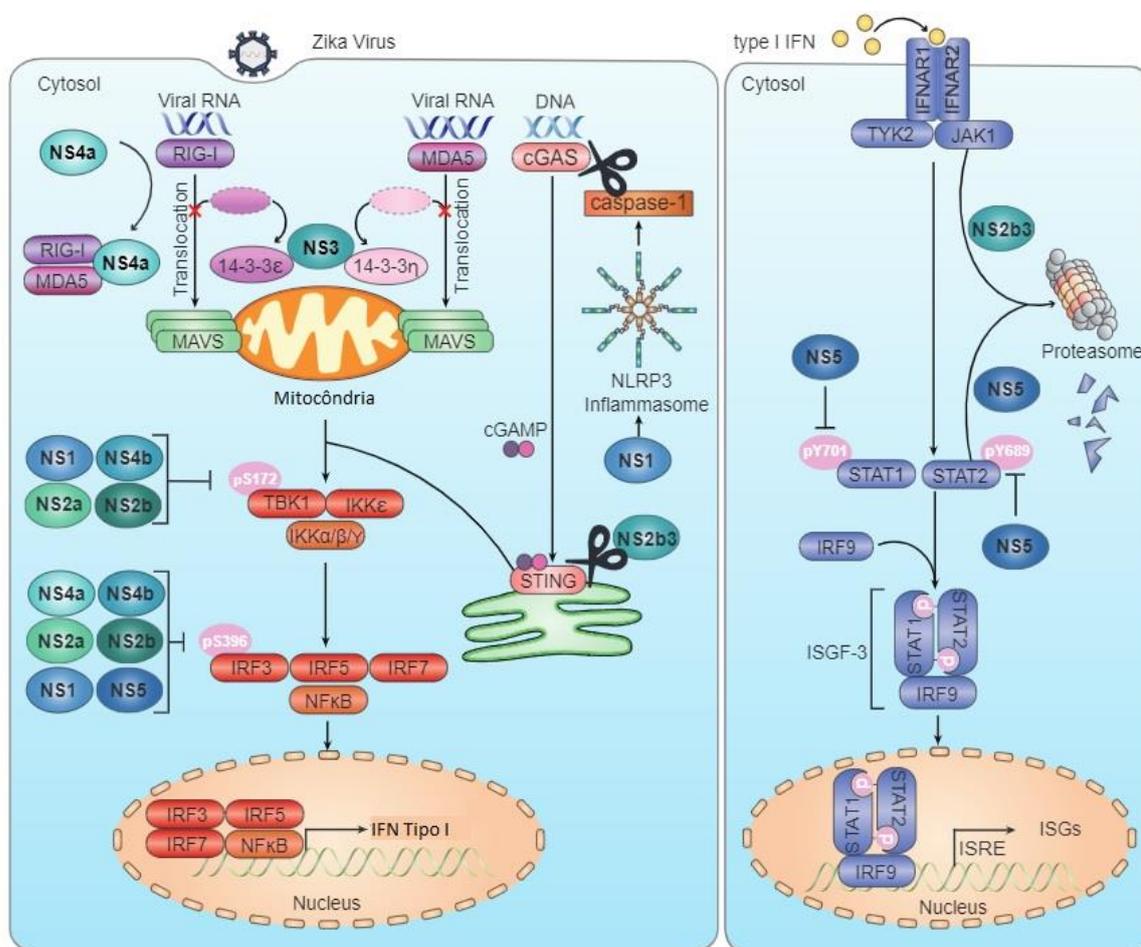


Figura 17. Evasão do sistema imune mediada pelo ZIKV. Vias de sinalização que levam à indução de interferon tipo I (IFN) e genes estimulados por IFN (ISG) e a inibição de alguns pontos destas vias por diferentes proteínas não estruturais de ZIKV (Fonte: adaptado de Serman *et al.*, 2019).

1.5. Polimorfismos

A variação genética é a matéria-prima da mudança evolutiva e, desde que Darwin propôs sua teoria da evolução por seleção natural, a quantidade e o padrão de variação genética dentro da população e das espécies têm sido objeto de investigação científica (SINGH, 2001).

Dois processos importantes são responsáveis pela variação genética: mutação e recombinação. A mutação é especialmente significativa porque é fonte primária da mudança evolutiva. Os novos alelos produzidos por mutação tornam-se molde para um segundo nível de organização, efetuado por recombinação (GRIFFITHS *et al.*, 2009).

As mutações são muitas vezes classificadas pelo tamanho da sequência de DNA alterada e outras vezes pelo efeito funcional da mutação na expressão gênica. As mutações podem ser por substituições – que podem ser transições ou transversões; inserções ou deleções (mutações *indel*). A transição é a substituição de uma base por outra de mesma categoria química, enquanto a transversão é o oposto: é a substituição de uma base de uma categoria química por uma base de outra. As mutações de inserção ou deleção são, na verdade, inserção ou deleção de pares de nucleotídeos. As mutações que afetam a estrutura ou organização dos cromossomos como, por exemplo, as duplicações, deleções e inversões são predominantemente resultado de recombinação entre segmentos de DNA com alta similaridade. Já às mutações gênicas como a substituição, podem se originar de dois processos: erros na replicação ou falha no reparo causados por lesões (GRIFFITHS *et al.*, 2009; NUSSBAUM *et al.*, 2008).

As consequências das mutações podem ser consideradas: sinônimas, não-sinônimas (sentido trocado), ou sem sentido. As sinônimas não alteram a sequência de aminoácidos da cadeia e, como consequência, não altera a conformação e/ou função da proteína produzida. A mutação não-sinônima, por outro lado, altera o códon do aminoácido, enquanto a mutação sem sentido muda o códon do aminoácido para um códon de parada (*stop* códon) (GRIFFITHS *et al.*, 2009).

Quando variações ocorrem em uma população geral, de forma estável, sendo encontradas com frequência de 1% ou superior, são denominadas polimorfismos genéticos. Além disso, os polimorfismos não estão relacionados ao

tipo de mutação que o causou, de quão grande é o segmento do genoma envolvido, ou se ele tem um efeito aparente sobre o indivíduo (METZGER *et al.*, 2006).

Polimorfismos são aspectos especiais da variação genética. Polimorfismo significa literalmente a presença em uma mesma população de duas ou mais alternativas de diferentes fenótipos. Ele pode ocorrer através de traços genéticos, fenotípicos ou fisiológicos, em qualquer segmento de DNA - codificante ou não (SINGH, 2001).

Os polimorfismos podem atuar como marcadores genéticos, já que são transmitidos associados a outros genes localizados na região cromossômica próxima a eles. Desta forma, se um gene próximo a um marcador causa uma doença, todos os indivíduos afetados na família recebem tanto o marcador como o gene causador da doença. Os polimorfismos também são responsáveis pela diversidade humana. Diferentes fenótipos são decorrentes de diferentes polimorfismos, como, por exemplo, o sistema de grupos sanguíneos ABO. De outro modo, os polimorfismos podem influenciar diretamente sobre fatores de risco associados a doenças comuns, como é descrito nos estudos envolvendo a estrutura genética das apolipoproteínas (ROCHA *et al.*, 2007).

Os avanços do projeto do genoma humano renovaram a apreciação e interesse no estudo das variações naturais no genoma humano. Cerca de 90% da variação do DNA humano é devido a alterações na base de nucleotídeo único. Em média, uma única diferença de pares de bases entre dois genomas humanos é observada para cada 1000 pb. Mas as chances de encontrar uma diferença podem ser 100 vezes maiores em algumas regiões do genoma do que em outras (KEATS *et al.*, 2013).

Existem várias classes de polimorfismos como, por exemplo, as inserções e deleções (microssatélites e indel), polimorfismos de inversão, variação no número de cópias, entre outras como demonstrado na figura 18. O *locus* do polimorfismo microssatélite possui três alelos, com quatro, cinco ou seis cópias de uma repetição trinucleotídica. O polimorfismo de inversão possui dois alelos correspondentes às duas orientações de um segmento genômico; tais inversões podem envolver regiões de até muitas bases de DNA. As variantes de número de cópias envolvem deleção ou duplicação de centenas de pares de quilobases até mais de uma megabase de DNA genômico. O polimorfismo de inserção por

elemento móvel possui dois alelos, um com e outro sem inserção de um retro elemento repetido; a inserção do elemento móvel altera o espaçamento entre os dois genes e pode alterar a expressão gênica na região (Fonte: Nussbaum, 2008)

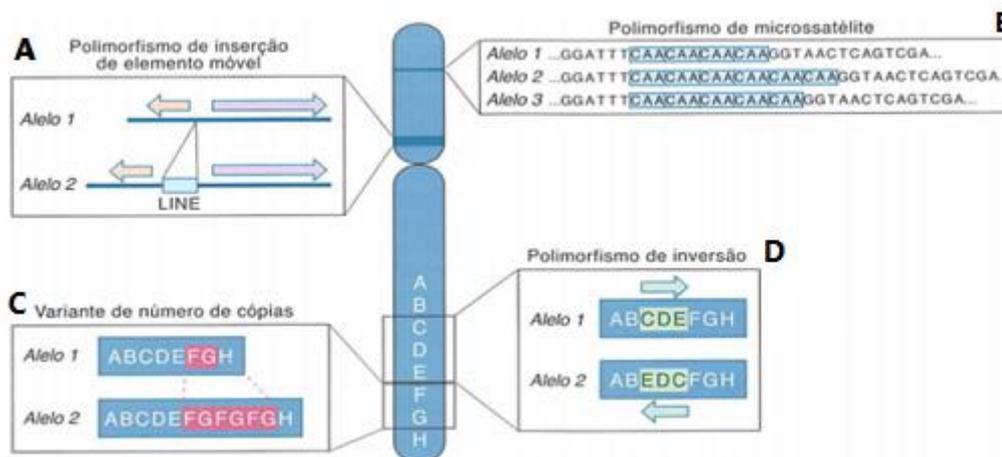


Figura 18. Exemplos de polimorfismos no genoma humano. (A) Polimorfismo de inserção de elemento móvel, (B) Polimorfismo de microssatélite, (C) Variante de número de cópias e (D) Polimorfismo de inversão (Fonte: Nussbaum, 2008).

Os mais simples e comuns de todos os polimorfismos são os polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs, do inglês, *single nucleotide polymorphisms*). Um *locus* caracterizado por um SNP geralmente tem apenas dois alelos, que correspondem a duas bases diferentes que ocupam uma localização específica no genoma (Figura 19).

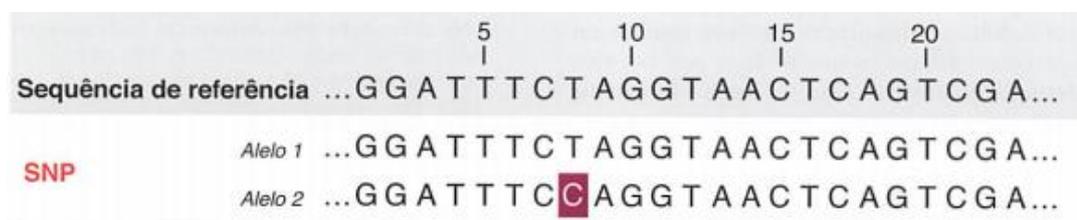


Figura 19. Exemplo de SNP. SNP a partir de um segmento do conjunto de referência do genoma humano demonstrado na parte superior. O SNP na posição 8 possui dois alelos, um com T (correspondente à sequência referência) e um com C (Fonte: Nussbaum, 2008).

Em geral, a probabilidade de encontrar um SNP é muito maior em regiões não codificadoras do que em regiões codificadoras. A maioria dos SNPs encontrados no genoma humano são originados muito depois da especiação, mas antes da separação em diferentes populações humanas. Isso explica a observação de que os SNPs humanos geralmente não são compartilhados com os primatas não humanos, mas são comuns a todas as populações; apenas cerca de 15% são considerados “privados”. Além disso, apenas alguns dos alelos SNP que

estavam presentes quando os seres humanos saíram da África se tornaram fixos (0% ou 100%) (KEATS *et al.*, 2013).

Os SNPs são comuns e observados, em média, uma vez a cada 1.000 pb no genoma. Entretanto, a distribuição de SNPs é desigual em todo o genoma; muito mais SNPs são encontrados em regiões não codificantes do genoma, em íntrons e em sequências que estão a alguma distância de genes conhecidos. No entanto, há ainda um número significativo de SNPs que ocorrem em genes e em outros elementos funcionais conhecidos no genoma. Para o conjunto de genes codificantes de proteínas, mais de 100.000 SNPs exônicos foram documentados até o momento. Cerca de metade desses não alteram a sequência de aminoácidos para a proteína codificada e são assim denominados de sinônimos, enquanto a outra metade altera a sequência de aminoácidos e compreendem os chamados não sinônimos. Esses SNPs não sinônimos são candidatos a apresentar consequências funcionais significativas em regiões codificantes (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

Como resultado de importantes iniciativas internacionais, cerca de 10 milhões de SNPs, tanto comuns quanto raros, foram identificados no genoma humano, e mais de 1,5 milhões foram genotipados em mais de mil indivíduos de 11 populações globais. Além disso, a detecção e caracterização de variantes do número de cópias (CNVs), que tendem a mapear segmentos duplicados, proporcionou acesso a variações importantes, particularmente em famílias de genes altamente duplicados, o que provavelmente contribuirá para algumas doenças comuns (KEATS *et al.*, 2013).

A importância da grande maioria dos SNPs para a saúde ainda permanece desconhecida e é objeto de pesquisas em andamento. O fato de os SNPs serem comuns, não significa que eles não apresentem efeito sobre a saúde e longevidade. Isto quer dizer que qualquer efeito de SNPs comuns está provavelmente mais envolvido na alteração sutil de suscetibilidade a doenças do que na causa direta de doenças sérias (NUSSBAUM *et al.*, 2008).

O funcionamento dos TLRs também pode ser afetado por SNPs nos genes que codificam os receptores TLRs. Além dos SNPs nos genes TLRs, os polimorfismos nos genes que codificam proteínas da via de sinalização ativada por TLRs, também podem afetar a funcionalidade dessas proteínas e assim levar a diferentes respostas frente a infecções.

A Zika é uma arbovirose que está em alta expansão no mundo, com risco de transmissão em qualquer localidade onde existam os mosquitos do gênero *Aedes*, o principal vetor da doença. Além disso, outros modos de transmissão estão sendo descritos na literatura, como a transmissão vertical e sexual, e, adicionalmente, já foi detectado o vírus em fluídos corporais como leite materno, urina e sêmen, o que demonstra o potencial elevado de transmissão deste vírus. A maioria dos pacientes com Zika são assintomáticos ou apresentam uma doença branda, a febre da Zika, nas quais a maioria dos sintomas são resolvidos espontaneamente. Porém, já foi comprovada que a infecção por zika pode causar complicações neurológicas graves como microcefalia em bebês e Síndrome de Guillain-Barré em adultos.

A resposta imune é importante tanto no controle como na patogênese da doença. Porém, ainda há uma carência de conhecimento sobre a patogenia e a resposta imune desencadeada por este vírus, bem como a associação de fatores inerentes ao hospedeiro como, por exemplo, a presença de polimorfismos como os SNPs, que podem estar relacionados com uma possível mudança no quadro de pacientes infectados. Alguns estudos já demonstraram que a presença de SNPs em genes codificadores de TLR e de proteínas envolvidas na cascata de fosforilação subsequente, pode estar envolvida com diferentes quadros de doença, ocorrendo ou a proteção adequada contra as infecções ou a evolução para desfechos mais graves.

Outro ponto importante é a escassez de dados disponíveis relacionados à presença de SNPs associados ao ZIKV. Em uma pesquisa no banco de dados do *PubMed* (NCBI) pelos termos “*Polymorphism*, TLR, vírus” foram encontrados 103 artigos, a busca com “SNP TLR vírus” resultou em 37 resultados, enquanto novas buscas com os termos “*Polymorphism*, TLR, ZIKV” e “SNP, TLR, ZIKV” não apresentaram resultados. Nesse contexto, nosso estudo propôs analisar em amostras de pacientes com ZIKV, que apresentaram manifestação no sistema nervoso, a presença de SNPs em genes codificadores de TLR e de proteínas envolvidas na cascata de fosforilação desencadeada por TLRs.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Avaliar o perfil genotípico em amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes infectados com ZIKV, com manifestações no sistema nervoso, quanto a presença SNPs associados a genes de TLRs e de proteínas da cascata de fosforilação ativada por TLRs.

2.2. Objetivos Específicos

- Identificar SNPs já publicados associados a infecções virais e relacionados a genes de TLRs e de proteínas da cascata de fosforilação ativada por TLRs e construir controles genotipagem;
- Avaliar, a presença dos SNPs identificados, em amostras de pacientes infectados com ZIKV com manifestações no sistema nervoso;
- Correlacionar a frequência dos SNPs encontrados com a frequência no banco SNPdb.

3. METODOLOGIA

3.1. Escolha dos alvos

Foi feita uma busca no PubMed (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/>) relacionada à SNPs já publicados com possíveis consequências em pacientes infectados com ZIKV. Essa busca não teve resultados relevantes, então foi feita uma pesquisa por SNPs associados a infecções virais, principalmente causadas por arbovírus com associação a genes de TLRs e de proteínas da cascata ativada por TLRs. Após essa busca, foram selecionados os SNPs rs8177374 no gene de *tirap* (LEVY et al., 2007), rs3775291 no gene de *tlr3* (HAGA et al., 2002) e rs179008 no gene de *tlr7* (MARTH et al., 1999). As mutações escolhidas são mutações missense (sentido trocado), ou seja, a alteração da base causa uma alteração de aminoácido e conseqüentemente, altera a proteína codificada. No SNP rs3775291 de *tlr3* a alteração ocorre de uma base C (citosina) para T (timina), gerando um aminoácido fenilalanina quando o correto seria uma leucina. No SNP rs179008 de *tlr7* a troca é de uma base A (adenina) para uma base T, alterando o aminoácido glicina, um aminoácido neutro, por uma leucina que é um aminoácido apolar. No SNP rs8177374 de *tirap* a mutação causa troca de uma base C por uma base T, mudando o aminoácido de serina (polar neutro) para leucina (apolar).

As sequências dos genes foram obtidas no GenBank (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genbank/>) e utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST), foi selecionada uma sequência de 100 a 150 pares de bases antes e após o local do SNP para desenho dos pares de oligonucleotídeos através da ferramenta *Pick Primers*. Foram escolhidas temperaturas de pareamento entre 50° e 57° com tamanho do fragmento amplificado de até 200 pares de base. Os oligonucleotídeos escolhidos foram analisados quanto a formação de *hairpin*, heterodímeros e homodímeros utilizando a ferramenta *OligoAnalyzer* da IDT (<https://www.idtdna.com/pages/tools/oligoanalyzer>). Essa metodologia foi utilizada para desenho dos pares de oligonucleotídeos para todos os alvos do estudo.

3.2. Amostras clínicas

Foram utilizadas amostras de líquido cefalorraquidiano (LCR) de pacientes com manifestações no sistema nervoso, coletadas no Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG (HIJPII), situado em Belo Horizonte/MG. O banco de amostras está localizado no Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) e contém aproximadamente 500 amostras, coletadas no período de 2014 a 2019, provenientes de crianças que deram entrada no hospital HIJPII com sinais de infecções como febre e apresentaram sintomas neurológicos como irritabilidade, sonolência e convulsões que justificaram a punção lombar. No estudo foram utilizadas 16 amostras de LCR que apresentaram positividade para presença do RNA viral do ZIKV por protocolo de Reação em Cadeia da Polimerase em Tempo Real (RT-qPCR), realizado no Laboratório de Vírus do Instituto de Ciências Biológicas (ICB) da UFMG. A média de idade desses pacientes foi de 4 anos sendo o mais velho com 12 anos e o mais novo com 13 dias. Em média, os pacientes ficaram internados por 10,6 dias sendo o maior período com 38 dias e o menor com 1 dia de internação. Todos tiveram alta após tratamento com uso de ceftriaxona, às vezes acompanhados de dexametasona. Três pacientes já apresentavam comorbidades antes da internação como asma, atraso do desenvolvimento neuropsicomotor e laringotraqueomalácia ao nascer. Este projeto foi aprovado no Comitê de Ética na Pesquisa do HIJPII (66691617.2.3002.5119) e no Comitê de Ética do Instituto René Rachou (Nº 66691617.2.3001.5091), com suporte financeiro das agências CAPES, CNPq, Instituto René Rachou, DECIT, PAPES VI/FIOCRUZ PrPq – UFMG e FNDCT N° 14/2016 - Prevenção e Combate ao vírus Zika.

3.3. Extração de DNA

Foi feita extração de DNA genômico total das amostras de LCR utilizando o *kit DNeasy Blood and Tissue* (Qiagen, Brasil), de acordo com as especificações do fabricante. Foram adicionados 20 µL da Proteinase K (600 mAU/mL) fornecida pelo kit em 10 µL do LCR, para otimização da lise das amostras. Os volumes foram ajustados para 220 µL com PBS. Foi adicionado nas amostras 200 µL do tampão de lise do kit, seguido de homogeneização e incubação a 56 °C por 60 minutos. Após a incubação, foram adicionados 200 µL de etanol 100% e

centrifugado na coluna disponibilizada no kit por 1 minuto a 6000 g. Foram adicionados os tampões de lavagem fornecidos, seguido de centrifugação nas mesmas condições anteriores. O DNA foi eluído com 100 µL do tampão de eluição, incubado por 1 minuto à temperatura ambiente, seguido de centrifugação por 1 minuto a ≥ 6000 g. Esse passo foi repetido mais uma vez para melhorar a qualidade e rendimento. A quantificação foi feita através do *NanoDrop* 1000 (Thermo Scientific, Brasil).

3.4. Construção dos controles de genotipagem

3.4.1. Reação em cadeia da polimerase (PCR)

Foram utilizadas amostras de LCR negativas para ZIKV, provenientes de pacientes do Hospital Infantil João Paulo II/FHEMIG (HIJPII), com diferentes celularidades (de 1 leucócito/mm³ a 260 leucócitos/mm³), para a montagem de um painel para construção dos controles de genotipagem: heterozigoto, homozigoto mutado e homozigoto normal. Primeiramente foi feita a PCR das amostras com os oligonucleotídeos desenhados. Foram testadas várias temperaturas de pareamento, entre 50 e 55 °C. O programa utilizado para amplificação dos fragmentos de DNA de cada alvo foi: 94 °C por 2 minutos, 40 ciclos de 94 °C por 30 segundos, 55 °C por 30 segundos, 72 °C por 30 segundos e finalmente 72 °C por 1 minuto. O DNA amplificado foi visualizado em gel de agarose a 1%. O DNA amplificado foi sequenciado para confirmar o genótipo de cada fragmento amplificado para os genes alvo e, a partir disso, foram escolhidos os amplicons a serem usados para construção dos controles de genotipagem. A banda correspondente ao fragmento desejado foi extraída do gel e purificada utilizando o *Kit Gel Band Purification* (GE Healthcare). Após a purificação, os fragmentos foram dosados em Nanodrop 100 (Thermo Fisher).

3.4.2. Clonagem dos fragmentos

Os fragmentos de DNA obtidos foram clonados no vetor *pGEM*[®]-*T Easy Vector* (Promega, Brasil) (Figura 20). O vetor *pGEM* é um vetor linearizado, sendo desnecessária uma digestão prévia com enzimas de restrição para linearização do mesmo. A reação foi feita seguindo a recomendação do fabricante e o cálculo para a quantidade de DNA utilizado foi feito através da equação:

$\frac{ng \text{ de vetor} \times \text{tamanho do inserto}}{\text{tamanho do vetor}} \times \text{razão inserto:vetor} = ng \text{ de inserto}$. Além das ligações dos produtos de PCR, foram empregados dois controles (vetor vazio e controle positivo) fornecidos pelo fabricante. A razão inserto:vetor utilizada foi a de 8:1. A ligação foi incubada a 4 °C durante a noite.

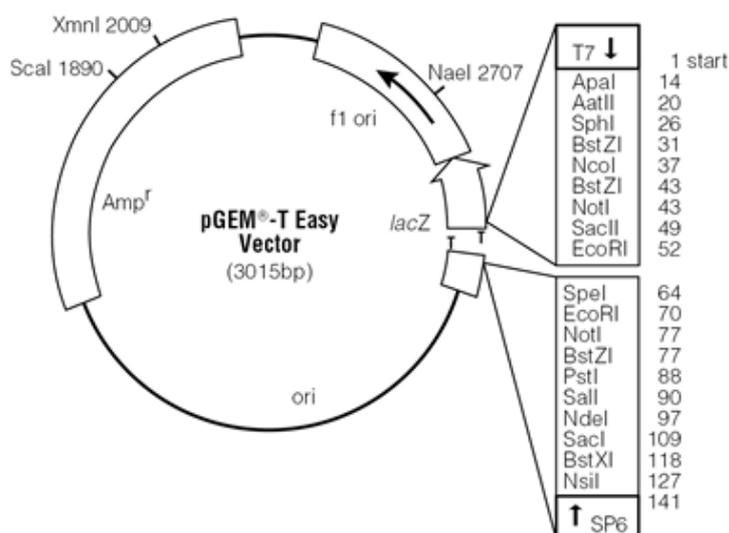


Figura 20. Mapa do plasmídeo pGEM[®]-T Easy. (Fonte: <https://www.promega.com/-/media/files/resources/protocols/technical-manuals/0/pgem-t-and-pgem-t-easy-vector-systems-protocol.pdf>)

3.4.3. Transformação bacteriana

Bactérias competentes da linhagem de *Escherichia coli* DH5α foram transformadas por choque térmico seguindo protocolo padronizado no Grupo de Imunologia de Doenças Virais. As bactérias foram mantidas em 1 mL de meio Luria Bertani (LB) (Extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, triptona 1%) durante a noite sob agitação a 37 °C. Desse pré-inóculo foi adicionado 1 mL em 100 mL de meio LB até a densidade óptica (DO) no comprimento de onda de 620 nm, entre 0,4 a 0,6. As bactérias foram centrifugadas por 3200 g por 10 minutos a 4 °C, o sedimento foi ressuscitado em solução gelada de cloreto de cálcio (CaCl₂) 100 mM e incubado no gelo por 20 minutos. Seguido de uma nova centrifugação à mesma condição anterior, o sedimento foi ressuscitado em solução gelada de CaCl₂ 100 mM e glicerol 15%. As bactérias foram alíquotadas em volumes de 100 µL e armazenadas a temperatura de -80 °C para uso posterior. A transformação bacteriana foi feita com a adição de 5 µL do produto de ligação (vetor + inserto) em 50 µL de bactérias competentes e mantida em banho de gelo por 30 minutos. O microtubo contendo as bactérias e o produto da ligação

foi colocado em banho maria a 42 °C por 90 segundos e logo depois em banho de gelo por 2 minutos. Depois foram acrescentados 500 µL de meio LB suplementado com glicose e incubado com agitação a 37 °C por 1 hora. Em seguida, o microtubo foi centrifugado por 5 minutos a 2000 RPM (448 g), descartados 400 µL do sobrenadante e o restante foi ressuscitado e plaqueado em meio LB ágar (Extrato de levedura 0,5%, cloreto de sódio 1%, triptona 1% e ágar bacteriológico 2%) contendo 100 µg/mL de ampicilina, IPTG 0,1M e 80 µg/mL X-Gal (para seleção de clones positivos) e incubadas na estufa a 37 °C durante a noite.

3.4.4. PCR de colônia

Para confirmação dos clones contendo o inserto, foram selecionados cinco colônias (com coloração branca indicativa da reação de IPTG e X-Gal) da placa com meio LB Ágar, incubados em 500 µL de meio LB simples e colocados em agitação por aproximadamente 2 horas. Para a reação de PCR foi utilizado 2 µL dessas colônias e as condições foram as mesmas utilizadas no tópico 4.3.1.2. O DNA amplificado foi fracionado em gel de agarose a 1%.

3.4.5. Minipreparação de DNA plasmidial

Os clones confirmados pela PCR de colônia foram incubados em um volume maior de meio LB para protocolo de extração plasmidial, empregando *Kit QIAprep Miniprep* (Qiagen). Foram incubados 50 µL da colônia positiva em 5 mL de meio LB acrescido de ampicilina (100 mg/mL), sob agitação a 37° por 16 horas. Desse inóculo 4 mL foram centrifugados a 8000 RPM (7168 g) por 3 minutos a temperatura ambiente. O sedimento obtido foi homogeneizado em 250 µL de tampão de lise P1 com auxílio do vórtex. Após essa etapa, foram acrescentados 250 µL de tampão P2, seguido de homogeneização por inversão e adicionados 350 µL de tampão de neutralização N3, seguido de homogeneização e centrifugação por 10 minutos a 13000 RPM (18928 g). Do produto obtido 800 µL foram transferidos para uma coluna fornecida pelo kit e centrifugados por 60 segundos a 13000 RPM (18928 g). Para lavagem da coluna, foram adicionados 750 µL de tampão de lavagem PE, seguido de centrifugação por 60 segundos. O DNA plasmidial foi eluído primeiramente em 40 µL, incubados por 1 minuto a temperatura ambiente e essa etapa foi repetida para aumento da qualidade e rendimento do DNA.

3.4.6. Sequenciamento de nucleotídeos e análise

O DNA plasmidial foi enviado para sequenciamento na plataforma de sequenciamento do Instituto René Rachou, Fiocruz Minas. O sequenciador utilizado é o Sequenciador de DNA - ABI 3730 da Thermo Fisher, utilizando o método de sequenciamento Sanger. O resultado foi analisado utilizando o software MEGA-X (S *et al.*, 2018) e o alinhamento foi feito com as sequências de referência.

3.5. Genotipagem por qPCR

Foram avaliados genes de alguns receptores TLR e de algumas proteínas da cascata de fosforilação disparada por TLRs além de genes codificadores de outras proteínas relacionadas com a resposta imune inata. Os SNPs selecionados foram analisados por ensaios de discriminação alélica por sondas TaqMan[®] (Thermo Fisher, Brasil). Os números de identificação dos SNP foram enviados para síntese do sistema de sondas e oligonucleotídeos prontos para uso para genotipagem. As reações foram feitas utilizando *GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix* de acordo com as recomendações do fabricante (Promega, Brasil).

A genotipagem das amostras foi realizada em colaboração com a aluna de doutorado em Microbiologia Natália Lima Pessoa do Laboratório de Vírus da UFMG, através da metodologia de sondas TaqMan[®] com fluoróforos VIC e FAM, demonstrada na figura 21. As sequências dos primers e sondas estão apresentadas na tabela 1. Para a reação foram utilizadas as quantidades recomendadas pelo fabricante: 10 µL do GoTaq[®] Probe qPCR Master Mix, 0,5 µL da sonda TaqMan[®] 40x, 5,5 µL de água livre de nucleases, 4 µL de DNA (20 ng). O volume final de reação foi de 20 µL. O programa de qPCR utilizado foi estágio de pré-leitura de 60 °C por 30 segundos; 95 °C por 10 minutos; 50 ciclos de 95 °C por 15 segundos; 60 °C por 1 minuto e 30 segundos e finalmente 60 °C por 30 segundos.

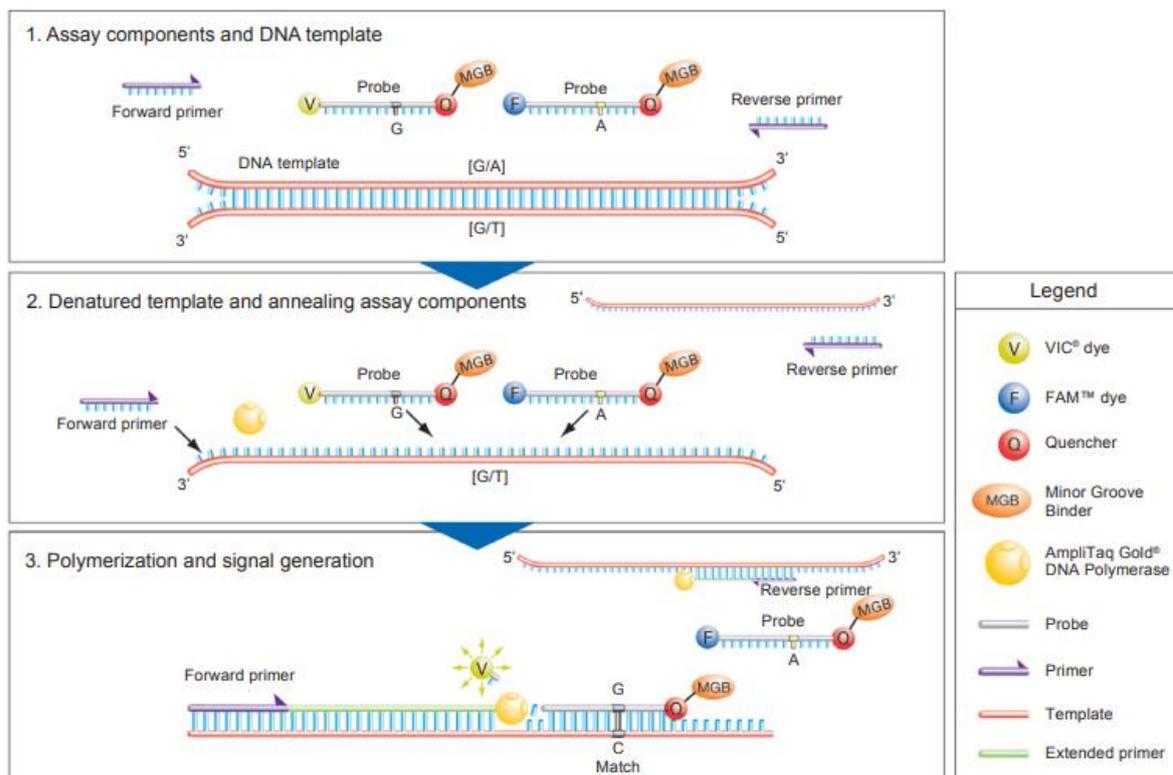


Figura 21. Metodologia de discriminação alélica com o uso de sondas TaqMan® (Fonte: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/cms_040597.pdf)

Tabela 1 - Sequências das sondas e primers TaqMan®

Gene	SNP ID	Sequência [VIC/FAM]
<i>tlr3</i>	rs3775291	ACTTGCTCATTCTCCCTTACACATA[T/C]TCAACCTAACCAAGAATAAAATCTC
<i>tlr7</i>	rs179008	TTCCAATGTGGACACTGAAGAGAC[A/T]AATTCTTATCCTTTTTAACATAATC
<i>tirap</i>	rs8177374	GAGGGCTGCACCATCCCCCTGCTGT[C/T]GGGCCTCAGCAGAGCTGCCTACCCA

Fonte: <https://www.thermofisher.com/br/en/home/life-science/pcr/real-time-pcr/real-time-pcr-assays/snp-genotyping-taqman-assays.html>

Os resultados foram analisados através do aplicativo *Genotyping*, disponível na plataforma online *Thermo Fisher Connect* (<https://www.thermofisher.com/br/en/home/digital-science.html>).

O teste estatístico utilizado pela plataforma é o teste de Qui Quadrado. O valor calculado do qui-quadrado é usado para determinar se os dados experimentais estão em equilíbrio de Hardy-Weinberg, com base no número observado e esperado de chamadas de genótipo, assumindo 1 grau de liberdade. O intervalo de confiança foi o de 95% ($p < 0,05$) (THERMO FISHER SCIENTIFIC, 2016).

4. RESULTADOS

4.1. Amostras clínicas

As amostras de LCR utilizadas no estudo foram provenientes do Hospital Infantil João Paulo II, que apresentaram alguma infecção, não por ZIKV, para construção dos controles de genotipagem e de pacientes com infecção por ZIKV para a identificação dos SNPs. Para construção dos controles de genotipagem foram utilizadas sete amostras: 534, 535, 560, 587, 590, 591 e 605. As amostras com diagnóstico de infecção por ZIKV selecionadas foram dezesseis: 512, 619, 740, 762, 818, 846, 847, 1013, 1024, 1025, 1032, 1054, 1078, 1137, 1150 e 1230. As amostras foram avaliadas em duplicatas na identificação de SNPs através de genotipagem por qPCR.

4.2. Construção dos vetores controles

Para construção dos controles de genotipagem foram sintetizados oligonucleotídeos. As sequências obtidas estão demonstradas na tabela 2.

Tabela 2 - Sequência de oligonucleotídeos usados para amplificar o DNA extraído de pacientes identificando os possíveis SNPs

Gene	SNP ID	Fragmento	Sequência
<i>tlr3</i>	rs3775291	114 bp	F - GCG AAC TTT GAC AAA TGA AAC A R - CCC AAC CAA GAG AAA GCA TC
<i>tlr7</i>	rs179008	172 bp	F - AGA GAG GCA GCA AAT GGG AA R - TAG GAA ACC ATC TAG CCC CA
<i>tirap</i>	rs8177374	181 bp	F - GGT GCA AGT ACC AGA TGC T R - CAA CGC ATG ACA GCT TCT TT

Fonte: dados do estudo.

A PCR para amplificação das sequências alvo foi feito com sete amostras de LCR negativas para ZIKV, a serem utilizadas para a construção dos controles, as quais foram genotipadas e alinhadas utilizando o software MEGA-X. Os resultados dos alinhamentos estão demonstrados na figura 22. Das sete amostras utilizadas, quatro foram selecionadas para construção dos controles de genotipagem por apresentarem bons resultados no sequenciamento e no alinhamento: amostra 605 para construção do controle normal do SNP rs3775291 no gene de *tlr3*, amostra 605 para construção do controle normal do SNP

rs179008 no gene de *tlr7* e as amostras 590 e 591 dos controles mutado e normal, respectivamente, do SNP rs8177374 no gene de *tirap* (Tabela 3).

Tabela 3 - Sequenciamento de amostras de LCR em geral, negativo para ZIKV, para construção dos controles

Alvo	Amostra	Genótipo
<i>tlr3</i> rs3775291	605	Base C (Normal)
<i>tlr7</i> rs179008	605	Base T (Mutação)
<i>tirap</i> rs8177374	590	Base T (Mutação)
	591	Base C (Normal)

Fonte: dados do estudo.

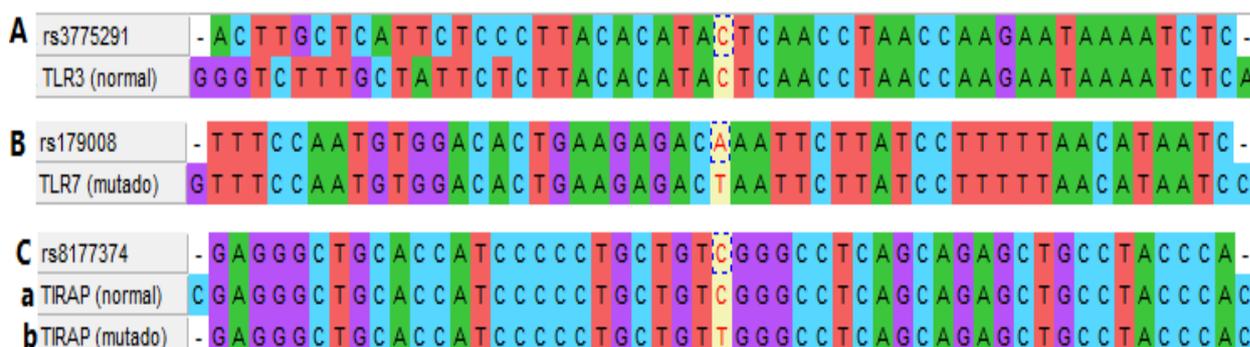


Figura 22. Alinhamentos das seqüências através do programa MEGA-X. As seqüências foram avaliadas quanto a qualidade pelo programa Chromas e alinhadas no programa MEGA-X. Em (A) alinhamento da seqüência da amostra 605 para o SNP rs3775291 no gene de *tlr3*, apresentando uma base normal C, (B) alinhamento da seqüência da amostra 605 para o SNP rs179008 no gene de *tlr7*, apresentando uma base mutada T e (C) alinhamento da seqüência das amostras 590 (a) apresentando uma base normal C e 591 (b) apresentando uma base mutada T para o SNP rs8177374 no gene de *tirap* (Fonte: dados do estudo).

Após a clonagem e transformação bacteriana, foram selecionados 5 clones positivos para realização da PCR de colônia. Os clones que tiveram amplificação do fragmento esperado (Figura 23), foram selecionados para do protocolo de minipreparação de DNA plasmidial e sequenciamento de nucleotídeos.

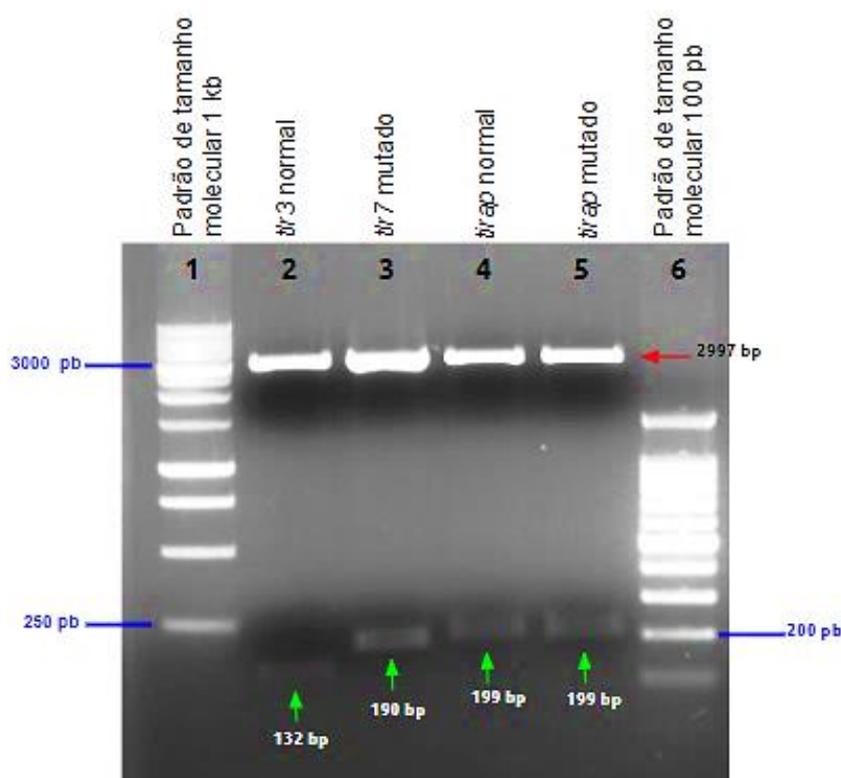


Figura 23. Foto de gel de agarose com a digestão dos controles construídos. A digestão dos plasmídeos foi feita com a enzima de restrição EcoRI e analisado em gel de agarose 1,4%. Os fragmentos de DNA mostrados pela seta vermelha representam a banda do plasmídeo (\pm 2997 bp). Os fragmentos mostrados pelas setas verdes correspondem ao inserto de interesse que foi clonado no plasmídeo: TLR3 com 132 bp, TLR7 com 190 bp e TIRAP com 199 bp. Foram utilizados dois padrões de tamanho molecular. Na canaleta 1 está o padrão de tamanho molecular de 1Kb e na canaleta 6 está o padrão de tamanho molecular de 100 pb, sendo as ampliações esperadas à esquerda (1 Kb) e à direita (100 pb) na imagem. Nas canaletas de 2 a 5 estão representados os controles de *tlr3* homocigoto normal, *tlr7* homocigoto mutado, *tirap* homocigoto normal e *tirap* homocigoto mutado, respectivamente. Legenda: bp = pares de base; Kb = Kilobases. (Fonte: dados do estudo)

4.3. Identificação dos SNPs empregando método de genotipagem por qPCR

4.3.1. Identificação de SNP de *tlr3* rs3775291

O DNA de 16 pacientes com LCR ZIKV positivo e com manifestações de SN foram testados para o alvo *tlr3* rs3775291. Os resultados obtidos indicam que o DNA de 12 pacientes deram resultado como homocigotos normais com genótipo C/C e uma como heterocigoto com genótipo C/T. As amostras 847 e 1230 tiveram ampliações em apenas uma das duplicatas, apresentando genótipo homocigoto normal. Apenas a amostra 818 não teve amplificação e, por consequência, não pôde ser genotipada (Figura 24). No ensaio os valores estatísticos foram: valor de $X^2 = 0,038$; valor de $p = 0,845$; frequência do alelo normal: 96%; frequência do

alelo mutado = 4%; frequência do genótipo homozigoto normal = 93%; frequência do genótipo heterozigoto = 7%; frequência do genótipo homozigoto mutado = 0% (Tabela 4). Devido ao valor de X^2 baixo e $p > 0,05$ os valores foram considerados não significativos. A intensidade de amplificação das sondas está demonstrada na figura 25.

Tabela 4 - Análise estatística do ensaio de genotipagem para o SNP rs3775291 no gene de *tlr3*

Frequências					X^2	p
Alelo 1 (Normal)	Alelo 2 (Mutado)	1/1	1/2	2/2		
96,429%	3,571%	92,857%	7,143%	0,000%	0,038	0,845

Fonte: dados do estudo. Legenda: 1/1 - Homozigoto normal; 1/2 - Heterozigoto; 2/2 - Homozigoto mutado; X^2 - Qui quadrado; $p < 0,05$ probabilidade de significância.

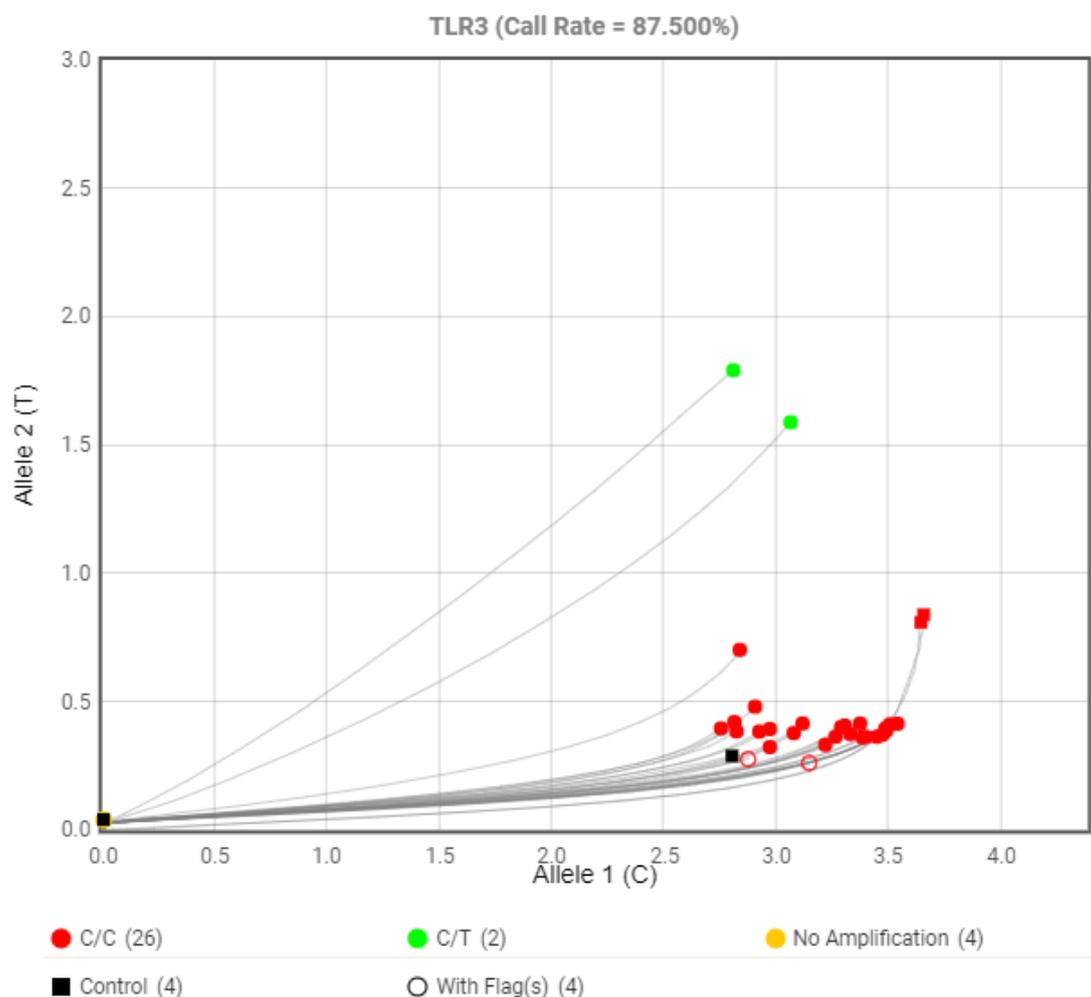


Figura 24. Genotipagem por discriminação alélica do SNP rs3775291 no gene de *tlr3* de DNA extraído de LCR de pacientes ZIKV positivos. O DNA de 16 pacientes foi empregado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs3775291 no gene de *tlr3*. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Qui Quadrado. Os controles estão representados por quadrados, sendo quadrados pretos controle negativo e em vermelho o controle homocigoto normal. As amostras estão representadas por círculos: círculos vermelhos representam amostras homocigotas normais e círculos verdes representam amostras heterocigotas. As formas que não estão preenchidas por cor (*with flags*) são amostras que tiveram algum problema na corrida como, diferentes genótipos em duplicatas. Os círculos em amarelo representam amostras que não tiveram amplificação (Fonte: dados do estudo).

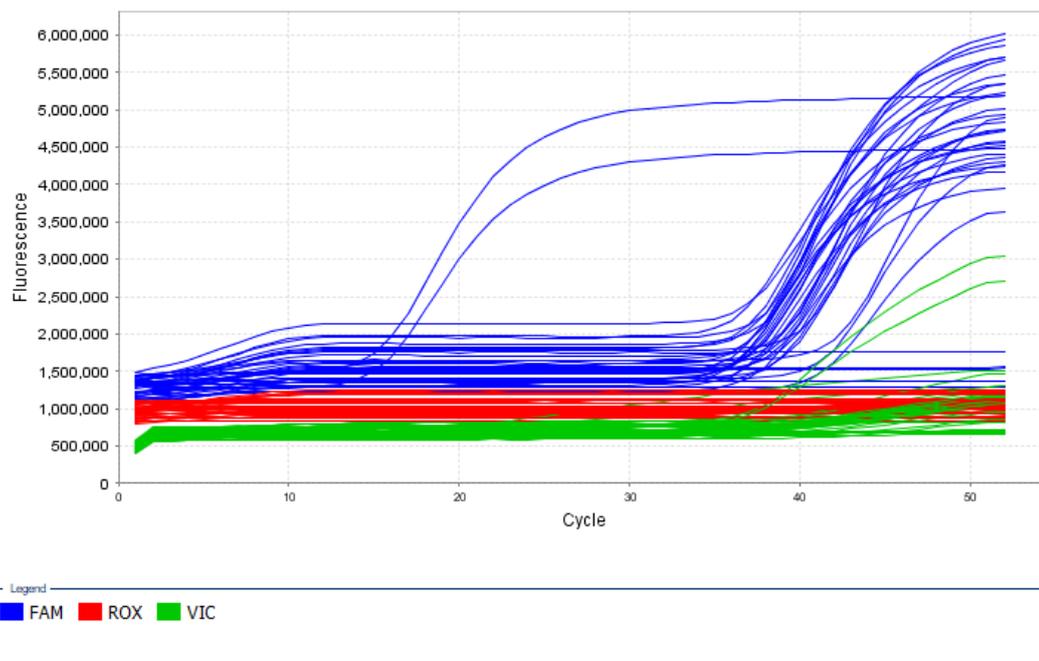


Figura 25. Intensidade de amplificação das sondas do SNP rs3775291 no gene de *tlr3*. No eixo X estão demonstrados os ciclos da qPCR. No eixo Y estão as intensidades das fluorescências (Fonte: dados do estudo).

4.3.2. Identificação de SNP de *tlr7* rs179008

O DNA de 16 pacientes com LCR ZIKV positivo e com manifestações no SN foram testados para o SNP de *tlr7*. Os resultados obtidos indicam que um paciente teve resultado homozigoto normal com genótipo A/A, 4 com genótipo heterozigoto A/T e 8 como homozigoto mutado com genótipo T/T. A amostra 740 apresentou amplificação em apenas uma das duplicatas, apresentando genótipo heterozigoto. A amostra 1150 apresentou genótipos distintos. Apenas a amostra 1230 não teve amplificação e, por consequência, não pôde ser genotipada (Figura 26). No ensaio os valores estatísticos: valor de $X^2 = 0,099$; valor de $p = 0,753$; frequência do alelo normal = 24%; frequência do alelo mutado = 76%; frequência do genótipo homozigoto normal = 7%; frequência do genótipo heterozigoto = 34%; frequência do genótipo homozigoto mutado = 59% (Tabela 5). Devido ao valor de X^2 baixo e $p > 0,05$ os valores foram considerados não significativos. No entanto, não se pode descartar definitivamente a importância dos dados de mutações, devido ao baixo número de amostras utilizado. A intensidade de amplificação das sondas está demonstrada na figura 27.

Tabela 5 - Análise estatística do ensaio de genotipagem para o SNP rs179008 no gene de *tlr7*

		Frequências			X^2	p
Alelo 1 (Normal)	Alelo 2 (Mutado)	1/1	1/2	2/2		
24,138%	75,862%	6,897%	34,483%	58,621%	0,099	0,753

Fonte: dados do estudos. Legenda: 1/1 - Homozigoto normal; 1/2 - Heterozigoto; 2/2 - Homozigoto mutado; X^2 - Qui quadrado; $p < 0,05$ probabilidade de significância.

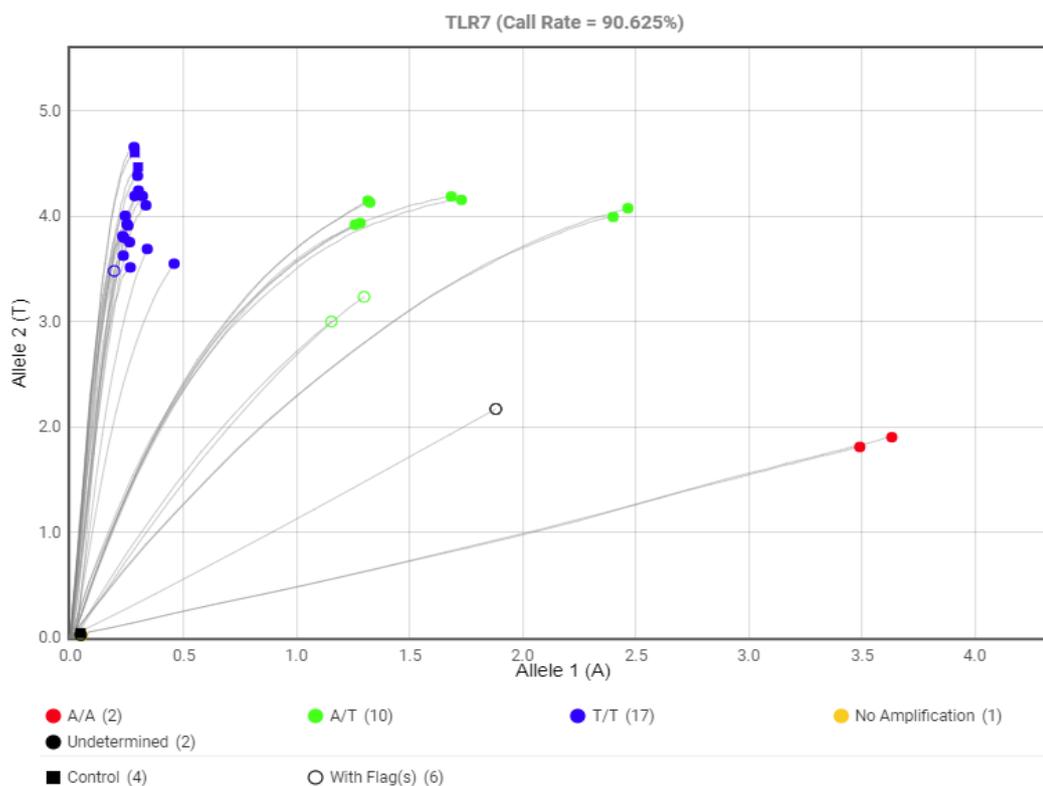


Figura 26. Genotipagem por discriminação alélica do SNP rs179008 no gene de *tlr7* de DNA extraído de LCR de pacientes ZIKV positivos. O DNA de 16 pacientes foi empregado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs179008 no gene de *tlr7*. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Qui Quadrado. Os controles estão representados por quadrados, sendo quadrados pretos o controle negativo e em azul controle homocigoto mutado. As amostras estão representadas por círculos: círculos vermelhos representam amostras homocigotas normais, círculo azul amostras homocigoto mutadas e círculos verdes representam amostras heterocigotas. As formas que não estão preenchidas por cor (*with flags*) são amostras que tiveram algum problema na corrida como, diferentes genótipos em duplicatas. Os círculos em amarelo representam amostras que não tiveram amplificação (Fonte: dados do estudo).

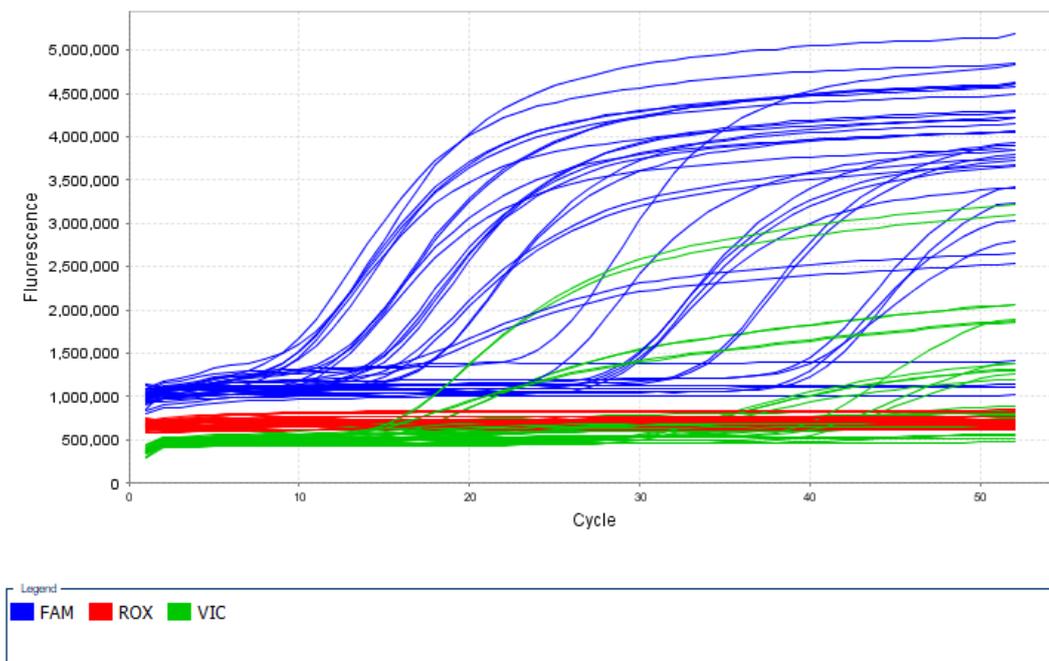


Figura 27. Intensidade de amplificação das sondas do SNP rs179008 no gene de *t1r7*. No eixo X estão demonstrados os ciclos da qPCR. No eixo Y estão as intensidades das fluorescências (Fonte: dados do estudo).

4.3.3. Identificação de SNP de *tirap* rs8177374

O DNA de 16 pacientes com LCR ZIKV positivo e com manifestações de SN foram testados para o alvo de *tirap*. Dos DNAs testados em duas amostras o resultado foi de homozigoto normal com genótipo C/C, 8 amostras são homozigotos mutados com genótipo T/T e 6 amostras tiveram duplicatas discrepantes (duas delas com genótipo heterozigoto C/T) ou não tiveram amplificação (Figura 28). No ensaio os valores estatísticos foram: valor de $X^2 = 16,668$; valor de $p = 0,000$; frequência do alelo normal: 22%; frequência do alelo mutado = 78%; frequência do genótipo homozigoto normal = 19%; frequência do genótipo heterozigoto = 7%; frequência do genótipo homozigoto mutado = 74% (Tabela 6). Devido ao valor de X^2 muito alto e p muito menor que 0,05, os valores foram considerados altamente significativos, ou seja, as mutações são verdadeiras, mesmo se considerando o baixo número de amostras. A intensidade de amplificação das sondas está demonstrada na figura 29.

Tabela 6 - Análise estatística de genotipagem para o SNP rs8177374 no gene de *tirap*

		Frequências			X^2	p
Alelo 1 (Normal)	Alelo 2 (Mutado)	1/1	1/2	2/2		
22,222%	77,778%	18,519%	7,407%	74,074%	16,668	0,000

Fonte: dados do estudos. Legenda: 1/1 - Homozigoto normal; 1/2 - Heterozigoto; 2/2 - Homozigoto mutado; X^2 - Qui quadrado; $p < 0,05$ probabilidade de significância.

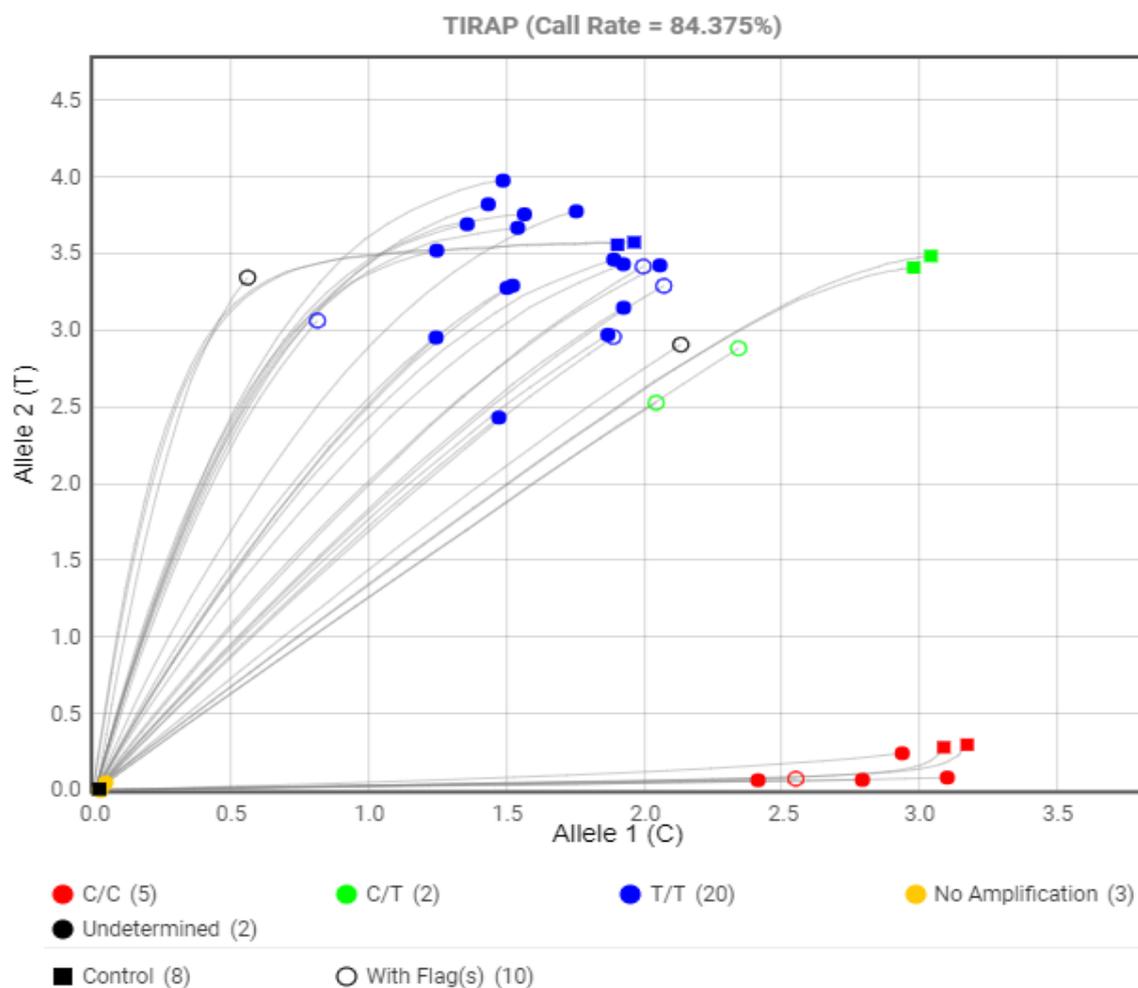


Figura 28. Genotipagem por discriminação alélica do SNP rs8177374 no gene de *tirap* de DNA extraído de LCR de pacientes ZIKV positivos. O DNA de 16 pacientes foi empregado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs8177374 no gene de *tirap*. Para as análises estatísticas foi utilizado o teste de Qui Quadrado. Os controles estão representados por quadrados, sendo quadrados pretos o controles negativos, em vermelho os controles homocigoto normal, em azul os controles homocigotos mutados e em verde os controles heterocigotos. As amostras estão representadas por círculos: círculos vermelhos representam amostras homocigoto normal, círculos azuis amostras homocigoto mutado e círculos verdes representam amostras heterocigotas. As formas que não estão preenchidas por cor (*with flags*) são amostras que tiveram algum problema na corrida como, diferentes genótipos em duplicatas. Os círculos em amarelo representam amostras que não tiveram amplificação (Fonte: Dados do estudo).

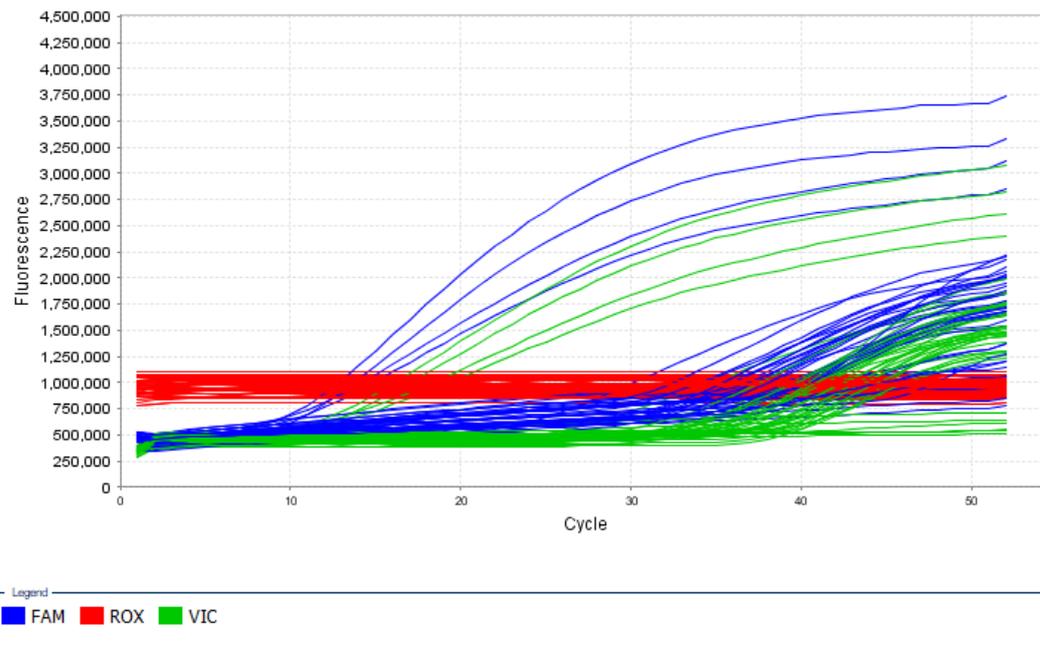


Figura 29. Intensidade de amplificação das sondas do SNP rs8177374 no gene de *tirap*. No eixo X estão demonstrados os ciclos da qPCR. No eixo Y estão as intensidades das fluorescências (Fonte: dados do estudo).

4.3.4. Sequenciamento de nucleotídeos de DNA amplificado para a genotipagem por qPCR para o SNP rs8177374 no gene de *tirap*

Para a validação da amplificação foi feito o sequenciamento de nucleotídeos para análise das bases presentes nas amostras nos locais onde há a possibilidade de ocorrer os SNPs avaliados. A análise do sequenciamento foi feita por alinhamento das sequências obtidas das amostras com sequências de referências no software MEGA-X e a análise da qualidade das bases nas posições do SNP foram avaliadas com o software Chromas (*Technelysium*, Austrália). As bases com qualidade inferior a 30 foram consideradas bases com qualidades ruins e foram desconsideradas. Os resultados obtidos foram: a amostra 512 foi a única no sequenciamento que apresentou uma fita com a base normal C. As outras amostras apresentaram fita com a base mutada T (Tabela 7). As amostras 740, 762, 818, 846, 1013 e 1025 apresentaram resultado inconclusivo nas leituras dos sequenciamentos e, por isso não estão presentes na tabela.

Tabela 7 - Resultado do sequenciamento de nucleotídeos do DNA amplificado na genotipagem por qPCR para o SNP rs8177374 no gene de *tirap*

Amostra	Genótipo	
	qPCR	Sequenciamento
512	Homozigoto normal	Homozigoto normal
619	T/T;C/T	Homozigoto mutado
847	NOAMP	Homozigoto mutado
1024	T/T;C/T	Heterozigoto
1032	UND;T/T	Heterozigoto
1054	Homozigoto mutado	Homozigoto mutado
1078	Homozigoto mutado	Homozigoto mutado
1137	Homozigoto mutado	Homozigoto mutado
1150	Homozigoto mutado	Homozigoto mutado
1230	UND;T/T	Homozigoto mutado

Fonte: Dados do estudo. O SNP rs8177374 no gene de *tirap* representa uma troca de base de C (citosina) por um T (timina). O ensaio foi realizado em duplicatas. Nas amostras com resultados diferentes nas duplicatas, os genótipos obtidos nas duplicatas estão representados separados por ponto e vírgula. Legenda: T/T: Homozigoto mutado; C/C: Homozigoto normal; C/T: Heterozigoto; NOAMP: sem amplificação; UND: genotipagem indeterminada.

4.4. Correlação das Frequências

Conforme demonstrado na introdução, as frequências de polimorfismos de SNPs observadas na população podem ser encontradas no banco de dados SNPdb. Na tabela 8 estão indicadas as comparações entre as frequências do SNPdb e as frequências observadas nos ensaios de genotipagem para os SNPs de *tlr3*, *tlr7* e *tirap* feitos com o DNA extraído de LCR de 16 pacientes ZIKV positivos. Os dados de frequência são relacionados a estudos com populações globais e com a população americana, pois não possuímos estes dados com populações brasileiras.

Tabela 8 - Análise comparativa entre as frequências de polimorfismos de alelos obtidas neste estudo com o de banco de dados

Alvo	População	Frequências Observadas	
		Alelo 1 (Normal)	Alelo 2 (Mutado)
<i>tlr3</i>	Global	C = 78%	T = 22%
	Americana	C = 69%	T = 31%
	Genotipagem do estudo	C = 96%	T = 4%
<i>tlr7</i>	Global	A = 84%	T = 16%
	Americana	A = 81%	T = 19%
	Genotipagem do estudo	A = 24%	T = 76%
<i>tirap</i>	Global	C = 68%	T = 32%
	Americana	C = 92%	T = 8%
	Genotipagem do estudo	C = 22%	T = 78%

Fonte: dbSNP (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/snp/>) e dados do estudo.

A frequência de alelos observada na análise das amostras do SNP rs3775291 no gene de *tlr3* foi correspondente à frequência observada tanto nos estudos a nível global quanto na população americana: no DNA das 16 amostras avaliadas a frequência do alelo normal foi de 96%, enquanto a frequência do alelo mutado foi de 4%. Já nos SNPs rs179008 no gene de *tlr7* e rs8177374 no gene de *tirap*, a frequência do alelo mutado foi maior que a frequência observada no banco de dados. Nas amostras para o SNP de *tlr7* a frequência do alelo normal foi de 24% e a frequência do alelo mutado foi de 76%. Já nas amostras para o SNP de *tirap* a frequência do alelo normal foi de 22% e a frequência do alelo mutado foi de 78% também o inverso do identificado nos bancos de dados.

5. DISCUSSÃO

As mutações são importantes para a variabilidade genética nas populações. Estas podem ser benéficas ou maléficas ao indivíduo, dependendo de onde e como ocorrem. Já foi descrito na literatura que os SNPs podem causar mudanças importantes em proteínas, alterando ou não a funcionalidade delas. Essas variações podem causar consequências como agravamento de quadros clínicos ou, por outro lado, podem gerar uma proteção contra infecções (GRIFFITHS *et al.*, 2009).

A metodologia de sondas TaqMan® para genotipagem de SNPs vem sendo utilizada cada vez mais, pois possui alto rendimento, tem uma boa precisão e com tempo de execução e análise dos resultados bastante rápido (SHEN *et al.*, 2009). Sua maior vantagem é o uso de duas sondas com dois fluorocromos que emitem fluorescência em espectros diferentes, permitindo a identificação de genótipos em diferentes alelos em uma mesma reação, o que anteriormente não era possível com o uso das metodologias disponíveis como, por exemplo, a técnica de PCR-RFLP (CAETANO, 2009). A desvantagem da técnica é o alto custo com equipamentos para realização dos ensaios bem como a compra de insumos.

TLR3 é responsável pelo reconhecimento de dsRNA, sendo encontrado na membrana endossomal de diversas células e tecidos. Ele tem um papel importante na replicação dos flavivírus e parece estar associado à patologia causada por esses vírus. Em estudo recente foi demonstrado que a infecção por ZIKV aumenta o nível de expressão de *tlr3*, embora a inibição desse receptor leve à diminuição de títulos virais. Esses dados levam a crer que TLR3 desempenha uma função na resposta inflamatória contra o ZIKV e também que o TLR3 atua na multiplicação viral (OJHA *et al.*, 2019). O SNP rs3775291 no gene de *tlr3* corresponde a uma alteração *missense*, ou seja, a troca da base altera o código genético de uma maneira que produz um aminoácido diferente do aminoácido usual nessa posição. Nesse caso, a troca ocorre entre uma base C por uma base T, o que leva à produção do aminoácido fenilalanina quando, na verdade, o normal seria uma leucina. Na literatura podem ser encontrados diversos estudos associando o SNP rs3775291 com infecções virais tanto para bem quanto para mal do paciente. Por um lado, esse polimorfismo pode estar associado com risco reduzido de infecção pelo vírus da encefalite transmitida por carrapatos (TBEV)

(KINDBERG *et al.*, 2011), *Human immunodeficiency virus* (HIV)-1 (SIRONI *et al.*, 2012) e infecções por *Herpes simplex virus* (HSV) -2 (SVENSSON *et al.*, 2012). Por outro lado, existe descrito na literatura a associação desse polimorfismo com a diminuição da ativação de IRF3 e NF- κ B, resultando na redução da produção de IFN-I, promovendo assim a proliferação viral (MUKHERJEE *et al.*, 2019). BIYANI *et al.* (2015) propuseram os possíveis mecanismos do polimorfismo TLR3 que afetam a fisiopatologia das infecções virais. Diferentes níveis da via de sinalização do TLR3 podem ser afetados (por exemplo, comprometimento da Ligante TLR3, ligação do ligante TLR3 defeituosa, sinalização a jusante prejudicada, ativação diminuída de células dendríticas, que são a ligação entre as imunidades inata e adaptativa, diminuição da atividade de espécies reativas de oxigênio e diminuição da produção de mediadores inflamatórios) e são responsáveis por progressão da doença em infecções virais (VERMA *et al.*, 2017). Devido à importância do TLR3 no reconhecimento e na resposta imune inata contra vírus, a frequência de alelos mutados do SNP analisado na população a nível global, é baixa, variando de 19,5% a 36%. Essa frequência baixa também é encontrada em diferentes populações, mas nunca passando de 36%. Na população analisada no nosso estudo, foi encontrada uma frequência de alelos mutados de aproximadamente 3,5%. O que também chama a atenção é a alta frequência do genótipo homocigoto normal nas amostras avaliadas. Apesar de a frequência encontrada estar abaixo do que é encontrado na literatura, esse fato pode ser explicado pelo baixo número amostral utilizado no ensaio além, da alta frequência de homocigotos normais nas amostras. Contudo, a baixa frequência de alelos mutados encontrada reflete o que está descrito no banco de dados. Os resultados do ensaio, principalmente a alta frequência de homocigotos normais, juntamente com a análise do banco de dados, podem levar ao raciocínio de que o SNP rs3775291 pode não estar envolvido com o desfecho clínico mais grave, com manifestações no sistema nervoso, em crianças infectadas por ZIKV.

Os resultados encontrados no nosso estudo para os SNPs de *tlr7* e *tirap* divergiram do encontrado no banco de dados em uma população saudável a nível global. A frequência de alelos mutados nas nossas amostras foi maior que a frequência encontrada no banco de dados.

O TLR7 é o receptor endossomal que reconhece fitas simples de RNA e oligoribonucleotídeos sintéticos (ORN). Ele é primariamente, mas não

exclusivamente, expresso em células hematopoiéticas como células dendríticas plasmocitóides e células B (SUN *et al.*, 2013). Um polimorfismo funcional no gene de TLR7 (rs179008) mostrou se estar associado à suscetibilidade a doenças autoimunes e infecciosas. Essa mutação é uma alteração *missense*, causando troca do aminoácido. Nesse caso, a base comumente encontrada é uma base A que é substituída por uma base T, alterando o aminoácido de uma glicina para uma leucina. Não está descrita significância clínica desse SNP no banco de dados dbSNP, porém, já é descrita associação desse SNP com a progressão de infecções virais como, por exemplo, em infecções por HIV-1 (SHAIKH *et al.*, 2019). Com os resultados obtidos, sugere-se que o agravamento das infecções por ZIKV pode ser devido à falha no reconhecimento do vírus pelo receptor TLR7, causado pela mutação no gene de *tlr7*, levando a uma alteração funcional nessa proteína. Considerando que o TLR7 é responsável pelo reconhecimento de RNA de fita simples e o ZIKV é um vírus de RNA fita simples, essa interação pode ser de grande importância para combate primário da infecção e, por consequência, um quadro mais branda da infecção. No entanto, devido à pequena quantidade amostral de pacientes, em comparação com a quantidade de amostras no banco de dados, e considerando a estatística obtida para *tlr7*, com um baixo qui-quadrado e valor de p igual a 0,753, não podemos afirmar, com certeza, que há uma relação deste SNP estudado de *tlr7* com a gravidade da doença.

O domínio do receptor Mal ou Toll *interleukin-1* contendo proteína adaptadora (TIRAP), é um componente essencial da sinalização de TLR2 e TLR4. Como mencionado anteriormente, TLR2 e TLR4 são responsáveis pelo reconhecimento de elementos bacterianos, de protozoários e virais (RSV). O SNP rs8177374 *missense*, altera uma serina para leucina (troca de base C para T) na região codificadora do gene *tirap*, podendo afetar o funcionamento da proteína e parece estar associado a várias doenças bacterianas (ALAGARASU *et al.*, 2015). Foram 41 citações sobre esse SNP no banco de dados, grande parte relacionada a infecções bacterianas. Um fato que chama a atenção nesse SNP é sua significância clínica que demonstra que ele confere proteção contra infecções por *Pneumococcus* (KHOR *et al.*, 2007), *Mycobacterium tuberculosis* (HAWN *et al.*, 2006) e, além disso, confere resistência contra malária (KHOR *et al.*, 2007). Não foram encontrados na literatura dados que elucidem a associação desse SNP com infecções por ZIKV ou por qualquer outro vírus, sendo nossos resultados pioneiros

nesse âmbito. Os dados do SNP de *tirap* neste nosso estudo mostram que, mesmo com uma quantidade pequena de pacientes, em comparação com o número de amostras do banco de dados, o aumento desta mutação em nossos pacientes é estatisticamente relevante, pois tem um valor de qui-quadrado alto e um p-valor igual a 0,000, sendo que neste caso podemos afirmar haver uma relação entre o aumento desta mutação e o agravo da doença.

Nossa hipótese é a de que essa mutação em *tirap*, por não permitir um reconhecimento inicial do ZIKV por TLR2 e/ou TLR4, que utilizam a proteína TIRAP, faz com que a defesa desses pacientes seja feita um pouco mais tarde pelos PRRs livres no citoplasma e/ou TLRs endossômicos, levando a um desfecho clínico mais grave inicialmente (sintomas de comprometimento do sistema nervoso), mas conseguindo se recuperar bem no final, pois não houve nenhum desfecho de óbito. Pode ser observada também a presença deste SNP nas amostras utilizadas para construção dos controles positivos, que foram feitos a partir de LCR de pacientes que foram negativos para ZIKV, o que nos leva a crer que o mau funcionamento de TIRAP pode resultar em quadros com consequências no SN iniciado por diferentes microrganismos ou outros fatores. Porém, para melhores esclarecimentos sobre essas associações, mais estudos são necessários, principalmente estudos voltados para a análise da resposta desencadeada por essa via de sinalização e reconhecimento.

Os dados obtidos em nosso trabalho são o início de uma nova linha de pesquisa de nosso grupo, que está se mostrando bastante complexa. Pensamos que os SNPs na sequência codificadora do receptor TLR7 e na sequência codificadora da proteína adaptadora TIRAP podem influenciar o desfecho clínico, para mais grave ou menos grave, devido à importância destes no reconhecimento e ativação da resposta imune inata dos pacientes analisados. Isto porque, por um lado, se houver deficiência de TIRAP, (que está na membrana celular e deve entrar em contato mais cedo com patógeno/moléculas do patógeno), os PRRs do interior da célula podem compensar este fato por uma resposta exacerbada, como por exemplo, provocando uma tempestade de citocinas, comprometendo o bem estar do paciente. Por outro lado, a ausência de função de TIRAP pode também por si só, comprometer a defesa eficiente do paciente, pelo fato de atrasar a resposta imune por TLRs da membrana celular.

6. CONCLUSÃO

Como conclusão mais importante do nosso trabalho, podemos observar que os SNPs rs8177374 no gene de *tirap* e rs179008 no gene de *tlr7*, em heterozigose ou em homozigose, estão presentes nas amostras avaliadas, em porcentagem maior do que a existente na população em geral encontrada no banco de dados, sendo esta diferença de porcentagem estatisticamente significativa no caso de TIRAP ($p = 0,000$). Apesar do baixo número amostral, a presença desses SNPs na população estudada, de crianças com infecção por ZIKV e manifestações no sistema nervoso, pode ser um indicativo da atuação dessas mutações para o desenvolvimento de um quadro mais grave nesses pacientes. O SNP no receptor TLR3 não foi encontrado nas amostras estudadas. Não observamos uma relação entre estas diferentes taxas de porcentagens de SNPs em *tlr7* e *tirap*, com a evolução dos exames realizados nos pacientes após a coleta dos LCRs, sendo que todos os pacientes tiveram alta. Apesar de não termos observado esta relação entre clínica final e mutação, os dados de SNPs muito acima da população global que consultamos no banco de dados são intrigantes e merecem uma pesquisa futura com maior profundidade.

Como perspectivas do trabalho, serão feitas análises com outros SNPs nas sequências codificadoras das proteínas MyD88, MCP-1, OAS3 e outro SNP de TLR3. Além disso, serão feitos ensaios para avaliar o perfil de citocinas dessas amostras na tentativa de melhorar o conhecimento do mecanismo de interferência dos SNPs na resposta imune, bem como de que maneira eles estão associados a uma possível relação com o quadro clínico desses pacientes. Adicionalmente, nosso grupo tem a intenção de continuar nesta linha de pesquisa, trabalhando com o mesmo banco de amostras para avaliação da presença de SNPs em amostras com outras infecções virais como dengue, febre amarela, herpes, entre outras.

REFERÊNCIAS

- ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. **Imunologia celular e molecular**. 7ª edição ed. 2012. 9788535247442.
- ADEREM, A.; ULEVITCH, R. J. Toll-like receptors in the induction of the innate immune response. **Nature**, 406, n. 6797, p. 782-787, 2000.
- AGUMADU, V. C.; RAMPHUL, K. Zika Virus: A Review of Literature. **Cureus**, 10, n. 7, p. e3025, 2018.
- ALAGARASU, K. *et al.* Polymorphisms in RNA sensing toll like receptor genes and its association with clinical outcomes of dengue virus infection. **Immunobiology**, 220, n. 1, p. 164-168, 2015.
- BAUD, D. *et al.* An update on Zika virus infection. **The Lancet**, 390, n. 10107, p. 2099-2109, 2017.
- BIYANI, S. *et al.* Toll-like receptor-3 gene polymorphism in patients with Japanese encephalitis. **J Neuroimmunol**, 286, p. 71-76, 2015.
- CAETANO, A. R. SNP markers: basic concepts, applications in animal breeding and management and perspectives for the future. **Revista Brasileira de Zootecnia**, 38, p. 64-71, 2009.
- CAMPOS, M. A. *et al.* Activation of Toll-like receptor-2 by glycosylphosphatidylinositol anchors from a protozoan parasite. **J Immunol**, 167, n. 1, p. 416-423, 2001.
- CAO-LORMEAU, V. M. *et al.* Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. **Emerg Infect Dis**, 20, n. 6, p. 1085-1086, 2014.
- CASANOVA, J. L.; ABEL, L.; QUINTANA-MURCI, L. Human TLRs and IL-1Rs in host defense: natural insights from evolutionary, epidemiological, and clinical genetics. **Annu Rev Immunol**, 29, p. 447-491, 2011.
- CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION - CDC. **Symptoms | Zika virus**. 2019. Disponível em: <https://www.cdc.gov/zika/symptoms/symptoms.html>.
- CHAMBERS, T. J. *et al.* Flavivirus genome organization, expression, and replication. **Annu Rev Microbiol**, 44, p. 649-688, 1990.
- DIALLO, D. *et al.* Zika virus emergence in mosquitoes in southeastern Senegal, 2011. **PLoS One**, 9, n. 10, p. e109442, 2014.
- DYER, O. Sixty seconds on . . . Zika virus. **BMJ**, 352, p. i467, 2016.

FARIA, N. R. do Socorro da Silva Azebedo R, Kraemer MUG, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**. Published online March, v. 24, 2016.

FRANCA, G. V. A.. *et al.* Congenital syndrome associated with Zika virus infection among live births in Brazil: a description of the distribution of reported and confirmed cases in 2015-2016. **Epidemiol Serv Saude**, 27, n. 2, p. e2017473, 2018.

GATHERER, D.; KOHL, A. Zika virus: a previously slow pandemic spreads rapidly through the Americas. **J Gen Virol**, 97, n. 2, p. 269-273, 2016.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. **The Lancet**, 371, n. 9611, p. 500-509, 2008.

GRARD, G. *et al.* Zika virus in Gabon (Central Africa)--2007: a new threat from *Aedes albopictus*? **PLoS Negl Trop Dis**, 8, n. 2, p. e2681, 2014.

GREEN, N. M.; MARSHAK-ROTHSTEIN, A. Toll-like receptor driven B cell activation in the induction of systemic autoimmunity. **Semin Immunol**, 23, n. 2, p. 106-112, 2011.

GRIFFITHS, A. J. F. *et al.* **Introdução à genética**. 9ª edição ed. 2009. 9788527714976.

HAGA, H. *et al.* Gene-based SNP discovery as part of the Japanese Millennium Genome Project: identification of 190,562 genetic variations in the human genome. Single-nucleotide polymorphism. **J Hum Genet**, 47, n. 11, p. 605-610, 2002.

HAMEL, R. *et al.* Zika virus: epidemiology, clinical features and host-virus interactions. **Microbes Infect**, 18, n. 7-8, p. 441-449, 2016.

HAWN, T. R. *et al.* A polymorphism in Toll-interleukin 1 receptor domain containing adaptor protein is associated with susceptibility to meningeal tuberculosis. **J Infect Dis**, 194, n. 8, p. 1127-1134, 2006.

HIGGS, S. Zika Virus: Emergence and Emergency. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 16, n. 2, p. 75-76, 2016.

HOLBROOK, M. R. Historical Perspectives on Flavivirus Research. **Viruses**, 9, n. 5, 2017.

HUG, H. *et al.* Toll-Like Receptors: Regulators of the Immune Response in the Human Gut. **Nutrients**, 10, n. 2, 2018.

IWASAKI, A.; MEDZHITOV, R. Toll-like receptor control of the adaptive immune responses. **Nat Immunol**, 5, n. 10, p. 987-995, 2004.

JANEWAY, C. A., Jr. Approaching the asymptote? Evolution and revolution in immunology. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, 54 Pt 1, p. 1-13, 1989.

JOHNS HOPKINS UNIVERSITY. **O que é Microcefalia?** Disponível em: <https://www.hopkinsmedicine.org/virus-da-zika/microcefalia.html>. Acesso em: 22 jan.

KEATS, B. J. B.; SHERMAN, S. L. Population Genetics. *In: Emery and Rimoin's Principles and Practice of Medical Genetics*, 2013.

KHOR, C. C. *et al.* A Mal functional variant is associated with protection against invasive pneumococcal disease, bacteremia, malaria and tuberculosis. **Nat Genet**, 39, n. 4, p. 523-528, 2007.

KINDBERG, E. *et al.* A functional Toll-like receptor 3 gene (TLR3) may be a risk factor for tick-borne encephalitis virus (TBEV) infection. **J Infect Dis**, 203, n. 4, p. 523-528, 2011.

KNIPE, D. M.; HOWLEY, P. **Fields Virology**. Sixth Edition ed. 2013. 978-1451105636.

KOSCHINSKI, A. *et al.* The membrane proteins of flaviviruses form ion-permeable pores in the target membrane after fusion: identification of the pores and analysis of their possible role in virus infection. **J Gen Virol**, 84, n. Pt 7, p. 1711-1721, 2003.

KRAEMER, M. U. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, 4, p. e08347, 2015.

KUHN, R. J. *et al.* Structure of dengue virus: implications for flavivirus organization, maturation, and fusion. **Cell**, 108, n. 5, p. 717-725, 2002.

KUMAR, H.; KAWAI, T.; AKIRA, S. Pathogen recognition in the innate immune response. **Biochem J**, 420, n. 1, p. 1-16, 2009.

LANDRY, M. L.; ST GEORGE, K. Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. **Arch Pathol Lab Med**, 141, n. 1, p. 60-67, 2017.

LEVY, S. *et al.* The diploid genome sequence of an individual human. **PLoS Biol**, 5, n. 10, p. e254, 2007.

LIM, K. H.; STAUDT, L. M. Toll-like receptor signaling. **Cold Spring Harb Perspect Biol**, 5, n. 1, p. a011247, 2013.

LIMA, G. K. *et al.* Toll-like receptor (TLR) 2 and TLR9 expressed in trigeminal ganglia are critical to viral control during herpes simplex virus 1 infection. **Am J Pathol**, 177, n. 5, p. 2433-2445, 2010.

MANSUR, D. S. *et al.* Lethal encephalitis in myeloid differentiation factor 88-deficient mice infected with herpes simplex virus 1. **Am J Pathol**, 166, n. 5, p. 1419-1426, 2005.

MARINHO, P. E. S. *et al.* Central and peripheral nervous system involvement in Zika virus infection in a child. **J Neurovirol**, 25, n. 6, p. 893-896, 2019.

MARTH, G. T. *et al.* A general approach to single-nucleotide polymorphism discovery. **Nat Genet**, 23, n. 4, p. 452-456, 1999.

METZGER, I. F.; SOUZA-COSTA, D. C.; TANUS-SANTOS, J. E. Farmacogenética: Princípios, Aplicações E Perspectivas. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, 39, n. 4, 2006.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Boletim Epidemiológico. SAÚDE, S. d. V. e. Brasil. 50: 11 p. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. PORTARIA Nº 1.171, DE 19 DE NOVEMBRO DE 2015. SECRETARIA DE ATENÇÃO À SAÚDE. 2015.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Zika Vírus: causas, sintomas, tratamento e prevenção**. 2017. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/zika-virus#tratamento>. Acesso em: 22/01.

MUKHERJEE, S.; HUDA, S.; SINHA BABU, S. P. Toll-like receptor polymorphism in host immune response to infectious diseases: A review. **Scand J Immunol**, 90, n. 1, p. e12771, 2019.

MUKHOPADHYAY, S.; KUHN, R. J.; ROSSMANN, M. G. A structural perspective of the flavivirus life cycle. **Nat Rev Microbiol**, 3, n. 1, p. 13-22, 2005.

NELSON, B. R. *et al.* Immune Evasion Strategies Used by Zika Virus to Infect the Fetal Eye and Brain. **Viral Immunol**, 2019.

NGO, V. N. *et al.* Oncogenically active MYD88 mutations in human lymphoma. **Nature**, 470, n. 7332, p. 115-119, 2011.

NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annu Rev Immunol**, 36, p. 279-308, 2018.

NURTOP, E. *et al.* A Report of Zika Virus Seroprevalence in Republic of the Congo. **Vector Borne Zoonotic Dis**, 20, n. 1, p. 40-42, 2020.

NUSSBAUM, R. L. *et al.* **Genética Médica Thompson & Thompson**. 7ª edição ed. 2008. 978-85-352-2149-7.

OJHA, C. R. *et al.* Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. **PLoS One**, 14, n. 2, p. e0208543, 2019.

ROCHA, A. P. *et al.* Genetic polymorphisms: implications in the pathogenesis of medullary thyroid carcinoma. **Arq Bras Endocrinol Metabol**, 51, n. 5, p. 723-730, 2007.

ROCK, F. L. *et al.* A family of human receptors structurally related to *Drosophila* Toll. **Proc Natl Acad Sci U S A**, 95, n. 2, p. 588-593, 1998.

S, K. *et al.* **MEGA X: Molecular Evolutionary Genetics Analysis across computing platforms**. 2018.

SAIZ, J. C. *et al.* Zika Virus: the Latest Newcomer. **Front Microbiol**, 7, p. 496, 2016.

SCREATON, G. *et al.* New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. **Nat Rev Immunol**, 15, n. 12, p. 745-759, 2015.

SEJVAR, J. J. Zika Virus and Other Emerging Arboviral Central Nervous System Infections. **Continuum (Minneap Minn)**, 24, n. 5, Neuroinfectious Disease, p. 1512-1534, 2018.

SERMAN, T. M.; GACK, M. U. Evasion of Innate and Intrinsic Antiviral Pathways by the Zika Virus. **Viruses**, 11, n. 10, 2019.

SHAIKH, N.; NIRMALKAR, A.; THAKAR, M. Polymorphisms in Toll-Like Receptors (TLRs)-7 and 9 Genes in Indian Population with Progressive and Nonprogressive HIV-1 Infection. **AIDS Res Hum Retroviruses**, 35, n. 6, p. 577-582, 2019.

SHEN, G. Q.; ABDULLAH, K. G.; WANG, Q. K. The TaqMan method for SNP genotyping. **Methods Mol Biol**, 578, p. 293-306, 2009.

SHIRLEY, D. T.; NATARO, J. P. Zika Virus Infection. **Pediatr Clin North Am**, 64, n. 4, p. 937-951, 2017.

SIMMONDS, P. *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: Flaviviridae. **J Gen Virol**, 98, n. 1, p. 2-3, 2017.

SINGH, R. S. Polymorphism. *In*: **Encyclopedia of Genetics**, 2001. p. 1507-1509.

SIRONI, M. *et al.* A common polymorphism in TLR3 confers natural resistance to HIV-1 infection. **J Immunol**, 188, n. 2, p. 818-823, 2012.

SKEVAKI, C. *et al.* Single nucleotide polymorphisms of Toll-like receptors and susceptibility to infectious diseases. **Clin Exp Immunol**, 180, n. 2, p. 165-177, 2015.

SONG, B. H. *et al.* Zika virus: History, epidemiology, transmission, and clinical presentation. **J Neuroimmunol**, 308, p. 50-64, 2017.

SUN, Y.; REDDY, P. Intracellular sensors of immunity and allogeneic hematopoietic stem cell transplantation. *In*: **Immune Biology of Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation**, 2013. p. 425-447.

SUY, A. *et al.* Prolonged Zika Virus Viremia during Pregnancy. **N Engl J Med**, 375, n. 26, p. 2611-2613, 2016.

SVENSSON, A. *et al.* Polymorphisms in Toll-like receptor 3 confer natural resistance to human herpes simplex virus type 2 infection. **J Gen Virol**, 93, n. Pt 8, p. 1717-1724, 2012.

TAHOTNA, A.; BRUCKNEROVA, J.; BRUCKNEROVA, I. Zika virus infection from a newborn point of view. TORCH or TORZiCH? **Interdiscip Toxicol**, 11, n. 4, p. 241-246, 2018.

TERZIAN, A. C. B. *et al.* Evidence of natural Zika virus infection in neotropical non-human primates in Brazil. **Sci Rep**, 8, n. 1, p. 16034, 2018.

THERMO FISHER SCIENTIFIC. **Applied Biosystems™ Genotyping Analysis Module**. 2016. Disponível em: https://assets.thermofisher.com/TFS-Assets/LSG/manuals/MAN0014821_GenotypingAnalysis_UG.pdf.

VENTURA, C. V. *et al.* Zika virus in Brazil and macular atrophy in a child with microcephaly. **The Lancet**, 387, n. 10015, 2016.

VERMA, R.; BHARTI, K. Toll like receptor 3 and viral infections of nervous system. **J Neurol Sci**, 372, p. 40-48, 2017.

VIDYA, M. K. *et al.* Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. **Int Rev Immunol**, 37, n. 1, p. 20-36, 2018.

WONG, S. H. *et al.* Virus-Like Particle Systems for Vaccine Development against Viruses in the Flaviviridae Family. **Vaccines (Basel)**, 7, n. 4, 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Countries and territories with current or previous Zika virus transmission. ORGANIZATION, W. H. : 1 p. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. **The history of Zika virus**. 2016a. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/timeline/en/>. Acesso em: 22 janeiro.

WORLD HEALTH ORGANIZATION - WHO. Situation Report - Zika virus, Microcephaly, Guillain-Barré Syndrome. ORGANIZATION, W. H. : 6 p. 2016b.

ZAMANI, M.; ZAMANI, V. Sexual Transmission of Zika Virus: An Assessment of the Evidence. **Iran J Public Health**, 46, n. 9, p. 1305-1306, 2017.

ZOLINI, G. P. *et al.* Defense against HSV-1 in a murine model is mediated by iNOS and orchestrated by the activation of TLR2 and TLR9 in trigeminal ganglia. **J Neuroinflammation**, 11, p. 20, 2014.