

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL

Mecanismos Moleculares envolvidos na Teratogênese do vírus Zika

Julia do Amaral Gomes

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular da UFRGS como requisito parcial para a obtenção do grau de **Doutora em Genética e Biologia Molecular**

Orientadora: Professora Fernanda Sales Luiz Vianna

Coorientadora: Professora Lavínia Schuler-Faccini

Porto Alegre, junho de 2021

Esse trabalho foi realizado no Laboratório de Genética Médica e Evolução do Departamento de Genética da UFRGS, com apoio financeiro do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INaGeMP) e do Fundo de Incentivo à Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (FIPE-HCPA).

AGRADECIMENTOS

São tantas as pessoas que fizeram parte desta importante etapa da minha vida e espero poder agradecer a cada uma delas destacando tudo o que representaram pra mim nesse período. Eu não poderia começar meus agradecimentos sem ser por eles, meus pais. Eu sei o quanto eles se dedicaram para que eu pudesse sempre me dedicar aos meus estudos e o quanto eles se orgulham de tudo o que eu consegui conquistar. Todas as minhas conquistas eu dedico a vocês, que são minha base e meu porto seguro.

Aos meus avôs e avós (*in memorium*), eu agradeço por todo o amor que me deram e por todo o apoio para que eu chegasse até aqui. Eu tenho certeza que sem os esforços de vocês a minha jornada não teria sido a mesma. Eu sei o quanto vocês, especialmente minha avó Rita, se orgulhavam de dizer que sua neta um dia seria doutora e, por isso, eu também dedico a vocês essa conquista.

Agradeço ao Julio – meu namorado –, aos meus padrinhos, meus primos – especialmente Denis e Gisele –, e todos os meus familiares por torcerem por mim. Eu sei que esta conquista representa muito pra vocês.

A pós-graduação me deu a oportunidade de conhecer professores e profissionais incríveis e agradeço a cada um deles por todos os ensinamentos transmitidos, conselhos e oportunidades. Primeiramente, agradeço à pessoa que guiou toda a minha trajetória, a minha orientadora, professora Fernanda. Certamente irão me faltar palavras para agradecer por tudo que ela fez por mim nesse período. A Fernanda é uma profissional incrível e uma pessoa maravilhosa. O que ela me ensinou foi muito mais do que eu esperava aprender. Sempre muito atenciosa e competente, se dedicou para que eu crescesse a cada dia sem pressão, mas me incentivando através do exemplo. Fez, muitíssimo obrigada por ter me aceitado como sua aluna lá em 2015 e por todo o carinho e dedicação que teve comigo nestes 6 anos. Tenho muito orgulho de ter sido sua aluna e espero que possamos trabalhar sempre juntas e em colaboração. A professora Lavínia, minha coorientadora, também merece muito mais do que eu posso escrever aqui. A Lav foi a pessoa que me recebeu na UFRGS

e aceitou ser minha orientadora. Um exemplo de profissional, de líder, de trabalho em equipe, de colaboração. Sempre muito generosa, busca abrir portas para os seus alunos e auxiliar para que cheguem cada vez mais longe. Foi uma das principais pesquisadoras a trabalhar para a caracterização clínica da Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika, se tornando ainda mais importante para o meu doutorado. Essa dupla fez o meu doutorado ser o que foi e me fez ser e estar onde eu estou hoje. Elas fizeram eu me apaixonar pela pesquisa, pela área das anomalias congênitas e teratogênese e por isso eu consegui chegar onde jamais tinha sonhado, onde atuo profissionalmente hoje. Sou muito grata por ter tido o privilégio de ser aluna de vocês.

Agradeço imensamente a todos os colaboradores do projeto multicêntrico do meu doutorado: Dra Bethânia, Dr Francis, Dra Thalita, Dra Denise, Dra Isabela, Dra Ana Cláudia e a querida Ju Herrero, bem como suas equipes em cada uma das cidades e estados que fazem parte deste projeto. Vocês foram fundamentais para que pudéssemos recrutar os indivíduos desta pesquisa, mas muito mais do que isso, pra que eu pudesse ter contato com os nossos pacientes, os conhecesse, entendesse sua realidade. Vocês me receberam sempre muito bem, me auxiliaram mesmo à distância sempre que precisei. Muitíssimo obrigada por tudo. Aos colaboradores internacionais, professora Hedvig, professor Danillo e professora Jill, agradeço por terem me ofertado tantas oportunidades. Minha experiência de doutorado foi muito além pelo contato com vocês. Os trabalhos que vocês me possibilitaram realizar e as experiências que me possibilitaram viver são um orgulho muito grande pra minha trajetória.

A minha equipe colaboradora do projeto, meu muito obrigada a cada um de vocês! Começo por ela que gosto de chamar de meu braço direito e esquerdo, minha companheira ao longo destes quatro anos, a Eduarda. Minha aluna de iniciação científica que foi o melhor presente que eu podia ganhar no começo do doutorado. Me auxiliou constantemente, em todas as diferentes etapas do meu projeto, sempre que eu precisava, independente da dificuldade ou do desafio envolvido. Muito obrigada pela parceria, Dudinha. Aos meus três parceiros para pensar nas hipóteses e discutir os resultados da tese, os quais também tenho a sorte e o prazer de chamar de grandes

amigos, Thayne, Luiza e Igor, meu muito obrigada por tudo. Vocês atuaram como colaboradores, revisores, amigos, psicólogos e fizeram da minha vida mais feliz e cheia de gratidão. Além deles, agradeço demais ao Juliano e ao Lucas, dois colaboradores sensacionais, assim como a minha querida Gabizinha. Muito obrigada pelas discussões, reuniões e revisões e trabalho em equipe. Eu não poderia ter escolhido equipe melhor pra trabalhar comigo.

Às minhas gurias da bioinformática, Malu e Giovanna, muito obrigada gurias. Vocês vieram pra somar (e facilitar a minha vida). Espero que a gente ainda desenvolva muitos trabalhos juntas.

Agradeço às professoras Maria Teresa e Patrícia Prolla pela colaboração e expertise em alguns dos trabalhos que compõem a minha tese. Duas profissionais de peso que tive a honra de trabalhar. Agradeço aos demais professores do PPGBM por todos os ensinamentos, em especial ao nosso prof. querido do laboratório 113, o prof. Nelson, pelas maravilhosas conversas e experiências trocadas.

Aos meus amigos do Lab113 e LMG meu muito obrigada por todas as conversas descontraídas, cafés, lanches, almoços, reuniões, por chorarmos as pitangas juntos. Um abraço mais especial às minhas queridas Mari, Bruna e Mirian. Sem esquecer daquelas que me escutavam e torciam por mim mesmo de longe (ou no Apolinário) e fazem parte dessa trajetória, as queridas Perp e Zu.

Dois amigos queridos, que fizeram parte desse doutorado e agora compartilham outras vivências comigo e se tornaram ainda mais especiais, Augusto e João. Guris, muito obrigada pela amizade, pela colaboração e pelo apoio vocês. O Augusto em especial sempre esteve comigo, seja no RS, no CE ou no DF, sempre nos encontramos, ele sempre me estende a mão, é um grande parceiro e amigo de verdade.

As minhas melhores amigas da vida, minhas irmãs, que deveriam receber honorários de psicólogas: Mariana, Samanta, Mayara, Claudinha, Aliny, Laiana, Tamires, Géssica, Carina e Débora. Gurias, vocês são a minha base. Vocês são a minha segunda família. De perto ou de longe vocês me apoiam, torcem por mim e me levantam sempre. Amo vocês demais.

Obrigada às gurias de Brasília, que mesmo me conhecendo a pouco tempo já foram tão generosas comigo. Eu sei que vocês já torcem muito por este meu momento.

Muito obrigada a todos vocês!

SUMÁRIO

Lista de Abreviaturas.....	11
Lista de Figuras e Tabelas.....	14
Resumo.....	15
Abstract.....	17
Capítulo I – Introdução.....	19
1. DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO.....	20
2. ANOMALIAS CONGÊNITAS.....	20
3. PRINCÍPIOS DA TERATOGENESE.....	22
4. INFECÇÕES CONGÊNITAS.....	23
5. VÍRUS ZIKA.....	24
5.1. Características gerais.....	24
5.2. Epidemiologia do vírus Zika.....	26
5.3. Infecção pelo vírus Zika.....	29
5.4. Tipos de transmissão.....	29
5.5. Diagnóstico da infecção.....	30
5.6. Complicações associadas à infecção pelo vírus Zika.....	31
5.7. Teratogênese do vírus Zika.....	33
5.8. Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika.....	34
5.9. Modelos <i>in vivo</i> e <i>in vitro</i> de investigação da infecção e teratogênese do vírus Zika.....	37
5.10. Mecanismos moleculares associados à infecção e teratogênese do vírus Zika.....	38
5.10.1. <i>Entrada do vírus Zika nas células.....</i>	39
5.10.2. <i>Resposta imune do hospedeiro.....</i>	40
5.10.3. <i>Alterações do ciclo celular e indução à apoptose.....</i>	42
5.10.4. <i>Impacto nos processos de neurodesenvolvimento.....</i>	43
5.11. A Síndrome Congênita Associada à Infecção pelo Vírus Zika como uma fenocópia de síndromes genéticas.....	44

6. SUSCEPTIBILIDADE GENÉTICA NA TERATOGENESE.....	44
6.1. Fatores de risco genéticos e ambientais na teratogênese do vírus Zika	45
Capítulo II – Justificativa.....	47
Capítulo III – Objetivos.....	50
PARTE I - Análises de expressão gênica diferencial.....	53
Capítulo IV – Artigo 1.....	54
Molecular Mechanisms of ZIKV-induced Teratogenesis: A Systematic Review of Studies in Animal Models.....	54
Capítulo V – Artigo 2.....	55
Downregulation of microcephaly-causing genes can induce Congenital Zika Syndrome: A Meta-analysis of RNA-Seq studies.....	55
PARTE II - Análises de suscetibilidade genética para a teratogênese do ZIKV.....	56
Capítulo VI – Artigo 3.....	57
<i>AXL</i> , <i>TLR3</i> and <i>STAT2</i> : a genetic and systems biology investigation regarding their impact on the Congenital Zika Syndrome.....	57
Capítulo VII – Artigo 4.....	58
Association between genetic variants in <i>NOS2</i> and <i>TNF</i> genes with Congenital ZIKV Syndrome and severe microcephaly.....	59
Capítulo VIII – Artigo 5.....	72
Influence of functional polymorphisms in the p53 pathway genes on the genetic susceptibility to ZIKV teratogenesis.....	73
Capítulo IX – Artigo 6.....	81
A polymorphism (rs531564) in the gene encoding miR-124 may contribute to the occurrence of Congenital Zika Syndrome.....	81
Capítulo X – Artigo 7.....	82
Case report: Whole-exome sequencing of discordant twins for Congenital Zika Syndrome.....	82
Capítulo XI – Artigo 8.....	83

Genetic susceptibility in Congenital Zika Syndrome: a systematic literature review and whole-exome sequencing of a case series with microcephaly....	83
PARTE III - Especulação sobre o papel do ZIKV em transtornos do neurodesenvolvimento.....	84
Capítulo XII – Artigo 9.....	85
Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects.....	86
Capítulo XIII – Discussão.....	94
Avaliação dos mecanismos moleculares de teratogênese do vírus Zika investigados através de revisão da literatura e meta-análise.....	97
Investigação da susceptibilidade genética para a teratogênese do ZIKV.....	98
Especulação sobre o papel da infecção pelo ZIKV durante a gestação e o desenvolvimento de Transtorno do Espectro do Autismo (TEA) em crianças expostas.....	102
Capítulo XIV – Conclusões.....	103
Capítulo XVI – Referências Bibliográficas.....	107
Capítulo XVII – Apêndice.....	125
Apêndice 1 - Representação Esquemática dos Centros Colaborativos e dos Locais de Origem dos Pacientes Incluídos no Estudo.....	126
Capítulo XVIII – Anexos.....	127
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – Caso – Projeto Nacional...	128
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – Controle – Projeto Nacional.....	130
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – Exoma – Síndrome Congênita por Zika vírus – Projeto Internacional.....	132
Termos de Consentimento Livre e Esclarecido – Exoma – Controle – Projeto Internacional.....	136
Questionário 1 – Clínico.....	140
Questionário 2 – Sociodemográfico.....	145

Produção científica adicional durante o doutorado.....	146
<i>I. Molecular mechanisms of Zika virus teratogenesis from animal studies: a systematic review protocol.....</i>	<i>147</i>

LISTA DE ABREVIATURAS

2D – Duas dimensões

3D – Três dimensões

ABraOM – Arquivo Brasileiro Online de Mutações

Akt-mTOR – Akt-mTOR *pathway*

AXL – *AXL receptor tyrosine kinase*

CLRs – *C-type Lectin Receptors*

CMV – Citomegalovírus

CXCL10 – *C-X-C motif Chemokine Ligand 10*

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

DENV – Vírus da dengue

ELISA – Ensaio de imunoabsorção enzimática

ENA – *European Nucleotide Archive*

ESPIN – Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional

GBS – Síndrome de Guillain-Barré

GEA – *Gene Expression Atlas*

GEO – *Gene Expression Omnibus*

gnomAD – *Genome Aggregation Database*

HIV – Vírus da imunodeficiência humana

HPO – *Human Phenotype Database*

HSV – Vírus herpes simples

IFN – Interferon

IFN-I – Interferon do tipo I

IgG – Imunoglobulina G (anticorpo)

IgM – Imunoglobulina M (anticorpo)

ISG15 – *Interferon-stimulated gene 15*

ISGs – *Interferon-stimulated genes*

MDM2 – *MDM2 Proto-Oncogene*

MER – *MER protein*

MERTK – *Proto-oncogene tyrosine-protein kinase MER*

miRNAs – *Micro Ribonucleic Acid*

mTOR – *Mammalian Target of the Rapamycin*

MX1 – *MX Dynamin Like GTPase 1*

NS – *Non-Structural protein*

NS1 – *Non-Structural protein 1*

NS2B – *Non-Structural protein 2B*

NS3 – *Non-Structural protein 3*

NS4A – *Non-Structural protein 4A*

NS4B – *Non-Structural protein 4B*

NS5 – *Nonstructural protein 5*

OAS2 – *2'-5'-oligoadenylate synthetase 2*

OMIM – *Online Mendelian Inheritance in Man*

OMS – *Organização Mundial de Saúde*

p53 – *p53 gene*

PAHO – *Pan American Health Organization*

prM – *pré-membrana*

RNA – *Ribonucleic Acid*

RT-PCR – *Reverse-Transcriptase Polymerase Chain Reaction*

SCZ – *Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika*

STAT2 – *Signal transducer and activator of transcription 2*

TAM – *Tyrosine kinases receptors family*

TIM – *Transmembrane immunoglobulin and mucin domain family*

TIM-1 – *T-cell immunoglobulin and mucin domain protein 1*

TLR3 – *Toll-like receptor 3*

TNF – *Tumor Necrosis Factor*

TORCH – *Acrônimo de Toxoplasmose, outras infecções (como a Sífilis, varicela-zoster, parvovírus, entre outros), Rubéola, Citomegalovírus e Herpes simples*

TYRO3 – *Tyrosine-protein kinase receptor TYRO3*

VZV – Vírus varicela-zoster

WHO – *World Health Organization*

WNV – Vírus do Nilo Ocidental

YFV – Vírus da febre amarela

ZIKV – Vírus Zika

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Lista de Figuras

Figura 1. O RNA genômico de fita positiva do ZIKV codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5).

Figura 2. Árvore filogenética destacando as linhagens africana e asiática do ZIKV. As cepas associadas aos surtos de infecções mais recentes, como os surtos na Polinésia Francesa em 2013, ou no Brasil em 2015, surgiram a partir da linhagem asiática.

Figura 3. Circulação do ZIKV da África para a Ásia e Américas de 1947 a 2016.

Figura 4. Estados com casos autóctones de infecção pelo vírus Zika, com confirmação laboratorial, no Brasil em 2015.

Figura 5. Período ideal para o diagnóstico da infecção pelo ZIKV através de RT-PCR e ou sorologia

Figura 6. Principais anomalias congênitas presentes na Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika.

Lista de Tabelas

Tabela 1. Alterações que podem ocorrer durante o desenvolvimento.

RESUMO

Em 2015, o vírus Zika (ZIKV) foi identificado como um teratígeno, capaz de causar anomalias congênitas em embriões e fetos expostos durante a gestação, as quais compõem a atualmente chamada Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ). Estudos moleculares descreveram que alterações da expressão gênica e proteica eram envolvidas na teratogênese do ZIKV. Além disso, se percebeu que o ZIKV causava anomalias em menos da metade os indivíduos (até 42%), discutindo-se o papel de fatores de risco genéticos na ocorrência desta condição. Assim, o objetivo desta tese foi investigar, através de diferentes abordagens, os mecanismos moleculares envolvidos na teratogênese do ZIKV, e descrever fatores genéticos de suscetibilidade para a ocorrência da SCZ.

Nós inicialmente conduzimos um estudo de revisão sistemática, descrevendo os principais mecanismos moleculares descritos como associados à teratogênese do ZIKV em modelos animais. Tais estudos descreveram genes de resposta antiviral como positivamente regulados no cérebro dos animais expostos, enquanto genes envolvidos de neurodesenvolvimento sofriam regulação negativa. Além disso, considerando que células neurais humanas são os principais alvos do ZIKV, conduzimos uma meta-análise de estudos de RNA-seq que avaliaram a expressão gênica nestes tipos de células após a exposição ao ZIKV. Identificou-se que genes envolvidos na resposta antiviral são positivamente regulados nestas células, enquanto dentre os genes negativamente regulados estavam aqueles que quando mutados causam microcefalia primária autossômica recessiva.

O papel da genética na suscetibilidade à SCZ foi inicialmente investigado através de estudos de caso-controle, com 40 crianças com SCZ e 48 crianças expostas ao vírus durante a gestação, que nasceram sem anomalias congênitas. Os genes investigados são pertencentes às principais vias biológicas descritas como envolvidas na infecção e teratogênese do ZIKV, como entrada e resposta ao vírus, resposta imune e inflamatória, regulação do ciclo celular e neurodesenvolvimento. Identificou-se que variantes em *NOS2* e *MIR124* podem atuar como fatores de risco

para a SCZ, e variantes em *TNF* e *TP53* podem atuar como fatores de risco para microcefalia e lisencefalia, respectivamente, em casos de SCZ.

Descrevemos ainda um caso de gêmeos discordantes para SCZ e, através da avaliação de seu exoma e comparação de suas variantes genéticas, identificamos variantes de possível risco para a SCZ no gêmeo afetado. Dentre estas, deleções e variantes de sentido trocado em genes atuam em processos de desenvolvimento e organização celular, os quais também são afetados pelo ZIKV, considerando a expressão gênica, sugerimos que tais variantes podem ter contribuído para a SCZ no gêmeo afetado, pois ele apresentaria uma combinação de fatores que tornariam tais processos, importantes para o desenvolvimento embrionário, menos eficientes.

Em outro estudo investigamos novamente fatores de risco genéticos para a SCZ, a partir do sequenciamento do exoma completo de uma série de casos com SCZ (n=4) e casos com microcefalia devido a uma etiologia desconhecida (n=4). Relatamos, em casos de SCZ, variantes de risco para a doença em genes que quando mutados causam fenótipos semelhantes à SCZ, como microcefalia.

Finalmente, considerando que os efeitos a longo prazo da exposição ao ZIKV durante a gestação ainda são pouco conhecidos, discutimos o papel que esse evento poderia ter na ocorrência de transtornos neurológicos, formulando uma hipótese de como o autismo poderia ocorrer em função desta exposição.

De maneira geral, os trabalhos desenvolvidos conseguiram alcançar o objetivo principal a que esta tese se propôs, investigando e discutindo, através de diferentes abordagens, mecanismos envolvidos com a teratogenicidade do ZIKV.

ABSTRACT

In 2015, the Zika virus (ZIKV) was identified as a teratogen, capable of causing congenital anomalies in embryos and fetuses exposed during pregnancy, which compose the currently called Congenital Zika Syndrome (CZS). Molecular studies described that alterations in gene and protein expression were involved in the ZIKV teratogenesis. In addition, it was reported that ZIKV caused anomalies in less than half the individuals (up to 42%), being discussed the role of genetic risk factors in the occurrence of this condition. Therefore, the aim of this thesis was to investigate, through different approaches, the molecular mechanisms involved in the ZIKV teratogenesis, and to describe genetic factors in the susceptibility to the occurrence of SCZ.

We initially conducted a systematic review study describing the main molecular mechanisms described as associated with ZIKV teratogenesis in animal models. Such studies described antiviral response genes up-regulated in the brain of exposed animals, while genes involved in neurodevelopment were down-regulated. Furthermore, considering that human neural cells are the main targets of ZIKV, we conducted a meta-analysis of RNA-seq studies that evaluated gene expression in these cell types after ZIKV exposure. It was identified that genes involved in the antiviral response are up-regulated in these cells, while among the down-regulated genes were those that, when mutated, cause autosomal recessive primary microcephaly.

The role of genetics in susceptibility to CZS was initially investigated through case-control studies, with 40 children with CZS and 48 children exposed to the virus during pregnancy, who were born without congenital anomalies. The investigated genes belong to the main biological pathways described as involved in ZIKV infection and teratogenesis, such as virus entry and response, immune and inflammatory response, cell cycle regulation and neurodevelopment. It was identified that variants in *NOS2* and *MIR124* can act as risk factors for CZS, and variants in *TNF* and *TP53* can act as risk factors for microcephaly and lissencephaly, respectively, in CZS cases.

We also describe a case of discordant twins for SCZ and, by evaluating their exome and comparing their genetic variants, we identified possible risk variants for CZS in the affected twin. Among these, deletions and missense variants in genes that act in cell development and organization processes, which are also affected by ZIKV considering the gene expression. Therefore, we suggest that such variants may have contributed to CZS in the affected twin, as he would present a combination of factors that would make such processes less efficient.

In another study, we again investigated genetic risk factors for CZS, through the whole-exome sequencing of a series of cases with CZS (n=4) and cases with microcephaly due to an unknown etiology (n=4). We report variants with a possible role in the occurrence of CZS in genes that, when mutated, cause phenotypes similar to CZS, such as microcephaly.

Finally, considering that the long-term effects of exposure to ZIKV during pregnancy are still poorly understood, we discuss the role that this event could play in the occurrence of neurological disorders, formulating a hypothesis on how autism could occur as a result of this exposure.

In general, the developed studies were able to achieve the aims proposed by this thesis, investigating and discussing, through different approaches, mechanisms involved with the teratogenicity of ZIKV.

CAPÍTULO I

INTRODUÇÃO

DESENVOLVIMENTO EMBRIONÁRIO E FETAL

O desenvolvimento embrionário humano consiste do período entre a fertilização e a oitava semana de gestação, a partir daí começa o desenvolvimento fetal do indivíduo (Carlson, 2014). Durante o período embrionário ocorre a organogênese (entre a 3^o à 8^o semana), momento no qual ocorre a formação dos principais órgãos e membros do indivíduo (Carlson, 2014). Desta forma, eventos ou exposições adversas que ocorram durante o período embrionário, mais especificamente durante a organogênese, são capazes de prejudicar de forma mais expressiva e estrutural o desenvolvimento do indivíduo (Carlson, 2014).

Embora no período embrionário ocorram os principais marcos do desenvolvimento, alguns tecidos e órgãos continuam sua maturação. O desenvolvimento do sistema nervoso central, por exemplo, se dá durante toda a gestação e, inclusive, continua após o nascimento do indivíduo (Carlson, 2014). Desta forma, o desenvolvimento de anomalias congênitas ou alterações funcionais em estruturas deste sistema podem se dar devido à ocorrência de eventos ou exposições adversas em qualquer momento da gestação (Carlson, 2014).

Ainda em relação ao desenvolvimento normal do indivíduo, uma série de eventos moleculares, biológicos, químicos e físicos devem acontecer de forma coordenada e dependendo de como e quando um evento adverso ocorre, ele pode acarretar tanto na morte do embrião ou feto, quanto induzir o desenvolvimento de anomalias congênitas mais ou menos graves (Finnel et al., 2002).

ANOMALIAS CONGÊNITAS

As anomalias congênitas são definidas como alterações morfológicas ou funcionais que ocorrem ainda dentro do útero e podem ser identificadas no pré-natal, no nascimento ou mais tarde na infância e podem ser maiores ou menores (WHO, 2020). Dependendo da etiologia e da forma como uma ou mais anomalias podem se apresentar em um indivíduo, existem diversas nomenclaturas que podem ser utilizadas (Quadro 1) (Hennekam et al., 2013).

Quadro 1. Nomenclaturas utilizadas para alterações que podem ocorrer durante o desenvolvimento.

Nomenclatura	Conceito/Etiologia
<i>Anomalia congênita</i>	Alteração morfológica ou funcional que representa um desvio substancial da população de referência.
<i>Malformação</i>	Anomalia congênita morfológica, não progressiva, de um único órgão ou parte do corpo, devido a uma alteração no programa de desenvolvimento primário.
<i>Deformação</i>	Forma ou posição alterada de uma parte do corpo, devido a força(s) mecânica(s) aberrante(s). Podem resultar em perda de simetria, alinhamento alterado, posição anormal ou configuração distorcida.
<i>Disrupção</i>	Anomalia congênita morfológica, não progressiva, devido à ruptura de uma estrutura corporal que tinha um potencial de desenvolvimento normal ou estava se desenvolvendo normalmente. Acontece no útero e, dependendo do tempo e natureza do evento perturbador, determinará as consequências no crescimento e desenvolvimento normal.
<i>Displasia</i>	Anomalia congênita morfológica surgida a partir da alteração dinâmica ou contínua da constituição das células, organização do tecido ou função de um órgão específico ou um tipo de tecido.
<i>Síndrome</i>	Padrão de anomalias congênitas considerado relacionado, do ponto de vista etiológico, onde pelo menos uma das anomalias é morfológica e se conhece a etiologia
<i>Sequência</i>	Uma ou mais anomalias congênitas morfológicas secundárias que surgem em cascata a partir de uma única malformação, ruptura, displasia ou deformação. Tais anomalias não são atribuídas diretamente a causa primária (etiologia), como um gene mutado, por exemplo.

Adaptado de Hennekam et al., 2013.

As anomalias congênitas são causadas por fatores genéticos, ambientais ou pela interação entre fatores genéticos e ambientais (Dolk et al., 2010). As causas genéticas incluem anomalias cromossômicas, microdeleções, mutações genéticas e alterações epigenéticas (como desordens no imprinting genético) (Dolk et al., 2010). As causas ambientais incluem infecções ou doenças maternas, nutrição, uso de determinadas medicações ou drogas e exposição a determinados agentes químicos (Dolk et al., 2010). Na maioria dos casos, o desenvolvimento de determinada anomalia congênita não está associado a uma única causa e apresenta uma origem multifatorial (Dolk et al., 2010).

Segundo a Organização Pan-Americana da Saúde (PAHO), as anomalias congênitas representam a segunda principal causa de morte infantil (crianças menores de 5 anos) nas Américas (PAHO, 2015). Ainda, de acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), em torno de 295.000 bebês morrem por ano nos primeiros 28 dias de vida devido a anomalias congênitas (OMS, 2020). Neste sentido, as anomalias congênitas têm impacto importante na mortalidade infantil, na qualidade de vida dos indivíduos afetados, no custo associado com cuidados médicos e especializados, além do impacto social que causam nos indivíduos e suas famílias (Dolk et al., 2010). Muitas anomalias congênitas não são compatíveis com a vida e levam ainda a abortos espontâneos (Dolk et al., 2010). No entanto, estas anomalias, assim como tantos outros tipos, são preveníveis, através do controle dos fatores de risco ambientais, com medidas como vacinação, fortificação ou suplementação alimentar, acompanhamento pré-natal, entre outras (Dolk et al., 2009).

PRINCÍPIOS DA TERATOGENESE

Um teratógeno é qualquer agente capaz de causar anomalias congênitas em um embrião ou feto exposto durante a gestação (Wilson, 1959). Medicamentos, drogas, agentes infecciosos, entre outros, são exemplos de agentes teratogênicos.

Os princípios da Teratologia foram formulados por James Wilson em 1959 e apresentados em 1977, sendo eles: (1) a susceptibilidade do embrião/feto ao dano

causado pelo teratígeno depende de seu *background* genético e da interação deste com fatores ambientais; (2) a susceptibilidade também depende do estágio do desenvolvimento que o embrião/feto se encontra no momento da exposição; (3) os teratígenos apresentam mecanismos de ação específicos para afetar as células e tecidos em desenvolvimento; (4) as consequências do desenvolvimento anormal causado por um teratígeno podem ser morte, malformações, retardo no crescimento e alterações funcionais; (5) a natureza do teratígeno influencia no dano causado e (6) a dose da exposição também influencia no dano causado, assim como sua gravidade (Wilson and Fraser, 1977).

Alguns mecanismos relacionados à teratogênese, especialmente envolvendo alterações genéticas e bioquímicas, foram também discutidos na época (Wilson and Fraser, 1977). Atualmente, outros mecanismos moleculares, importantes para o desenvolvimento embrionário, vêm sendo também associados à teratogênese, como o controle epigenético ou exercido por pequenos RNAs não codificantes na expressão genética, por exemplo (Friedman, 2010).

INFECÇÕES CONGÊNITAS

Dentre os diferentes agentes que podem atuar como teratígenos, é possível destacar uma variedade de patógenos capazes de afetar o desenvolvimento do embrião ou feto durante a gestação (Chiodo et al., 1993).

O acrônimo STORCH, por exemplo, incluindo a Sífilis, a Toxoplasmose, a Rubéola, o Citomegalovírus e o Herpes simples, representa um grupo de infecções que afetam o desenvolvimento do embrião ou feto (Stegmann et al., 2002). Tais infecções são causadas pelo *Treponema pallidum*, *Toxoplasma gondii*, vírus da Rubéola, Citomegalovírus (CMV), e vírus da Herpes simples (HSV), respectivamente, e podem se manifestar através de sintomas leves ou moderados na mãe, mas impactar consideravelmente o desenvolvimento do feto, causando anomalias congênitas, alterações importantes no sistema nervoso central ou a morte (Stegmann et al., 2002; Voekt et al., 2017).

Alguns destes vírus são conhecidos por causar danos, intrauterinos ou pós-natais, no desenvolvimento do cérebro, como é o caso do citomegalovírus, vírus da rubéola e vírus da imunodeficiência humana, por exemplo (Waldorf et al., 2013). Os resultados de danos causados no desenvolvimento cerebral e no sistema nervoso central (SNC) após a infecção por vírus podem variar devido a diferenças no tropismo de células específicas, respostas inflamatórias, estratégias de replicação dos vírus e do genótipo da mãe e do bebê. Existem algumas anomalias que são causadas, de forma bastante semelhante, por diferentes vírus, e isso é explicado pela área e estágio específico do desenvolvimento afetado no momento da infecção (Rubin et al., 1999).

A partir de 2015, uma nova infecção congênita foi descoberta, a infecção pelo vírus Zika (ZIKV), sendo este vírus reconhecido como um novo teratígeno em 2016 (Schuler-Faccini et al., 2016; Kleber de Oliveira et al., 2016; WHO, 2016a). A infecção pelo ZIKV durante a gestação foi associada com desenvolvimento de diversas anomalias congênitas, sendo a microcefalia o fenótipo identificado inicialmente nos bebês como sendo causado pelo vírus (Kleber de Oliveira et al., 2016; Melo et al., 2016; Nunes et al., 2016).

VÍRUS ZIKA

Características gerais

O vírus Zika (ZIKV) é um arbovírus que pertence à família Flaviviridae, mesma família do vírus da dengue (DENV), febre amarela (YFV) e vírus do Nilo Ocidental (WNV) (Plourde et al., 2016). Ele foi isolado pela primeira vez em 1947, a partir de um macaco *rhesus*, na floresta Zika de Uganda (Dick et al., 1952).

O ZIKV é um vírus de RNA de fita simples de sentido positivo que apresenta um genoma contendo 10.794 pares de base que codifica uma poliproteína clivada, por proteases do hospedeiro e do próprio vírus, em três proteínas estruturais (capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Figura 1) (Kuno and Chang, 2007; Pierson &

Diamond, 2018). A proteína do envelope (E) do ZIKV apresenta 50% de conservação comparando a proteína do DENV, no entanto, apesar desta similaridade ter potencial de favorecer a resposta imune, gera confusões no diagnóstico e pode gerar reações imunes adversas em indivíduos expostos ao ZIKV e DENV (Barba-Spaeth et al., 2016; Pierson & Diamond, 2018).

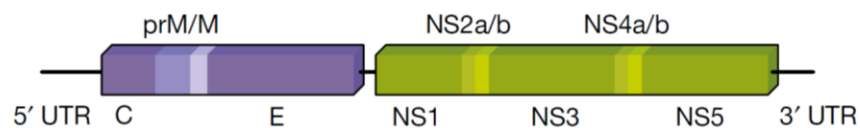


Figura 1. O RNA genômico de fita positiva do ZIKV codifica uma poliproteína que é clivada em três proteínas estruturais (C, prM e E) e sete não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Adaptado de Pierson & Diamond, 2018.

Do ponto de vista filogenético, o ZIKV pode ser classificado em duas linhagens, africana e asiática (Figura 2) (Haddow et al., 2012). A linhagem africana surgiu na África Oriental e a linhagem asiática surgiu durante a migração do vírus da África para a Ásia (Faye et al., 2014). As cepas de ZIKV que circulam nas Américas são descendentes da linhagem asiática e são as responsáveis pelos efeitos adversos da infecção, reconhecidos especialmente a partir de 2015, envolvendo o sistema nervoso central dos indivíduos infectados (Pierson & Diamond, 2018; Hu et al., 2019).

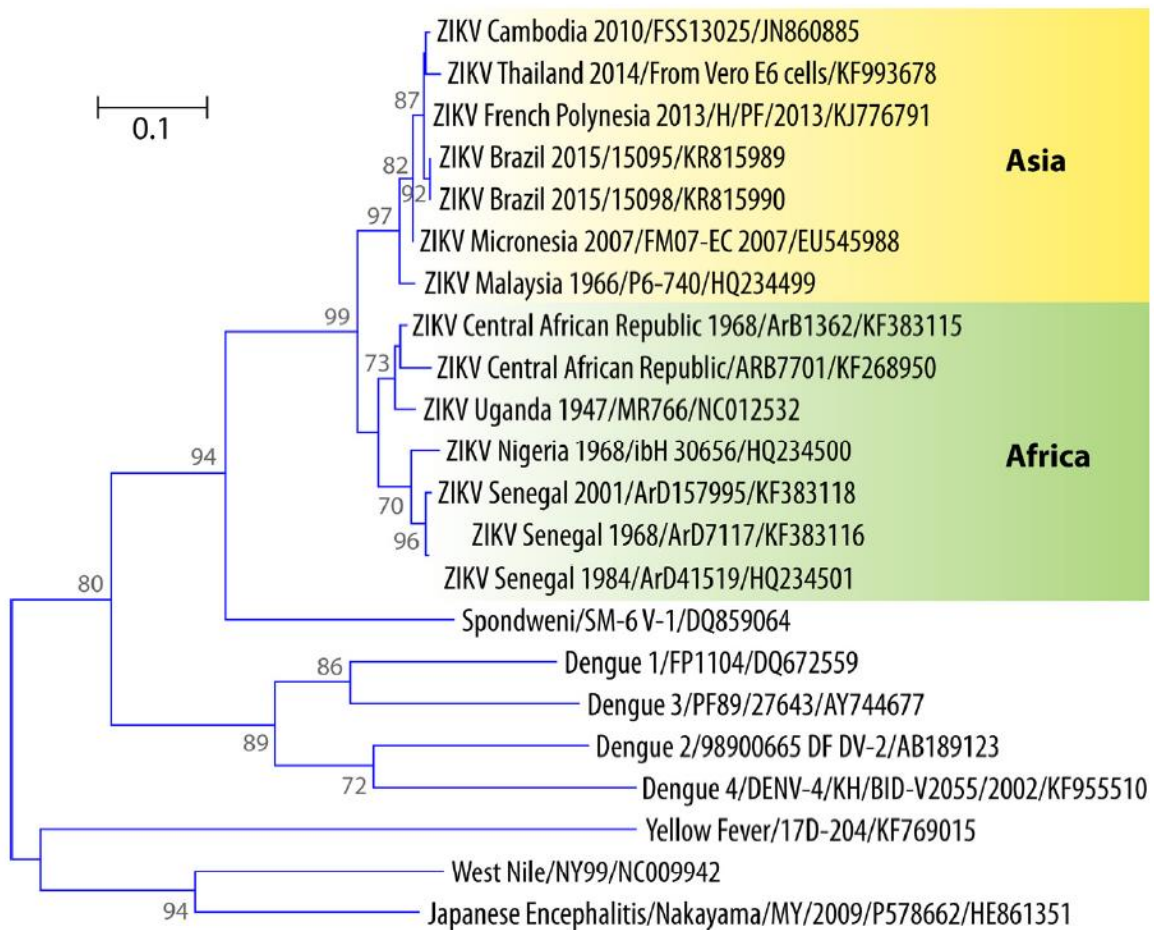


Figura 2. Árvore filogenética destacando as linhagens africana e asiática do ZIKV. As cepas associadas aos surtos de infecções mais recentes, como os surtos na Polinésia Francesa em 2013, ou no Brasil em 2015, surgiram a partir da linhagem asiática. Adaptada de Musso & Gubler, 2016.

Epidemiologia do vírus Zika

Os primeiros três casos de infecção humana pelo ZIKV foram relatados na Nigéria, em 1954 (Macnamara, 1954). Pequenos agregados esporádicos de infecções humanas na África e na Ásia ocorreram desde então, entretanto, a partir de 2007, a área geográfica de ocorrência do vírus se expandiu drasticamente (Figura 3) (Hayes, 2009). Em 2007, um surto de infecções pela cepa asiática do ZIKV foi reportado em Yap, nos Estados Federados da Micronésia (Duffy et al., 2009). Posteriormente, surtos

ocorreram na Polinésia Francesa em 2013 e nas Ilhas Cook, Ilha de Páscoa e Nova Caledônia, em 2014 (Cao-Lormeau et al., 2014; Roth et al., 2014; Zanluca et al., 2015). A partir de 2015, surtos começaram a ser relatados nas Américas (PAHO, 2015).



Figura 3. Circulação do ZIKV da África para a Ásia e Américas de 1947 a 2016. Adaptado de OMS, 2016.

No Brasil, em fevereiro de 2015, casos de uma síndrome indeterminada, com presença de exantema e sintomas leves, começaram a ser relatados e acompanhados nos estados da região Nordeste do Brasil (Brasil, 2015a). Dada as características clínicas, infecções por outros patógenos, incluindo arbovírus, foram investigadas (Brasil, 2015a).

O primeiro caso de transmissão autóctone de ZIKV no país foi registrado em abril de 2015 (Brasil, 2015b). Ainda em 2015, 19 estados confirmaram transmissão autóctone da doença (Figura 4), sendo o maior número de casos notificados provenientes da região nordeste e havendo surtos da infecção pelo ZIKV descritos na Bahia e Pernambuco (Brasil, 2016; Campos et al., 2015; Pessoa et al., 2016).

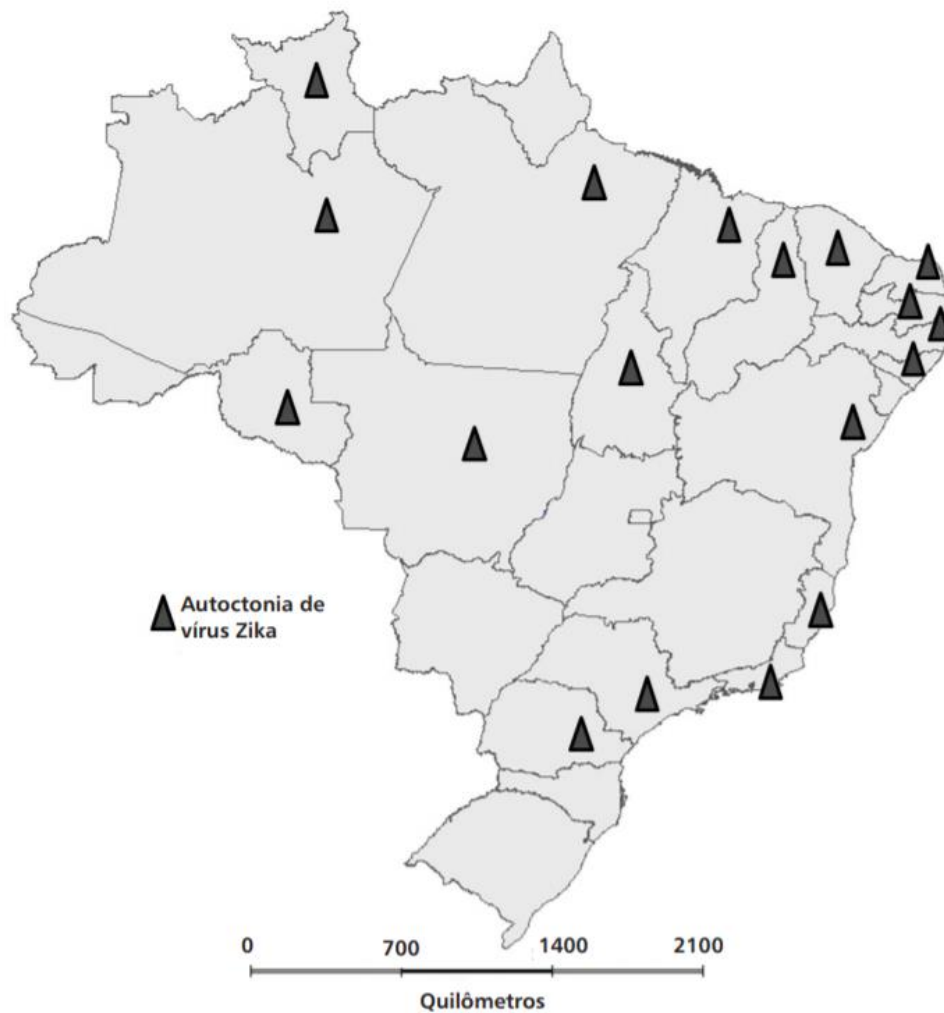


Figura 4. Estados com casos autóctones de infecção pelo vírus Zika, com confirmação laboratorial, no Brasil em 2015. Adaptado de Brasil, 2016.

Em 2016, 216.207 casos prováveis de infecção por ZIKV foram notificados ao Ministério da Saúde, sendo cerca de 60% destes confirmados e maior incidência na região Centro-Oeste (Brasil, 2017a; Brasil, 2018). Em 2017, 17.452 casos prováveis de infecção por ZIKV foram notificados ao Ministério da Saúde e destes 50% foram confirmados, sendo as regiões Centro-Oeste e Norte àquelas com as maiores incidências (Brasil, 2018). Nos anos de 2018, 2019 e 2020 o número de casos diminuiu consideravelmente, sendo 8.680, 10.768 e 7.387 casos prováveis notificados, respectivamente (Brasil, 2019; Brasil, 2020a; Brasil, 2021a)

Infecção pelo vírus Zika

A apresentação clínica da infecção por ZIKV nos indivíduos foi relatada como pouco específica, incluindo erupções cutâneas (também chamado de *rash* cutâneo), fadiga, mialgias, febre baixa, dor de cabeça e, menos frequentemente, conjuntivite e artralgia, podendo ser confundida com outras infecções, como pelo vírus da dengue (DENV) ou pelo vírus chikungunya (CHIKV) (Campos et al., 2015; Musso et al., 2018).

O período de incubação do ZIKV em humanos, ou seja, o tempo de contágio até o aparecimento dos sintomas, é cerca de 3 a 7 dias (Musso & Gubler, 2016; Musso et al., 2018). No entanto, estima-se que 80% dos casos infectados sejam assintomáticos (Duffy et al., 2019). Menos frequentemente, a infecção tem sido associada ao desenvolvimento de complicações mais graves, como meningite, encefalite e síndrome de Guillain-Barré (Carteaux et al., 2016; Cao-Lormeau et al., 2016).

O ZIKV persiste no sangue total de forma prolongada, em uma média de 22 dias (variando de 14 a 100 dias), podendo ser positivo mesmo depois que o plasma e outros fluidos corporais se tornam negativos (Mansuy et al., 2017). O RNA do ZIKV em espermatozoides e no sêmen é encontrado em humanos por até 6 meses, embora o vírus em si permaneça apenas nas primeiras semanas a partir do início dos sintomas (Mead et al., 2018). O ZIKV também persiste no olho, sendo detectado em humanos por até 30 dias após o aparecimento da doença (Tan et al., 2017).

Até o momento, não há vacina ou tratamento específico para combater a infecção pelo ZIKV, sendo apenas prescritas medicações para o combate dos sintomas, como febre e dor, por exemplo (Brasil, 2015a).

Tipos de transmissão

O ZIKV é transmitido aos seres humanos através da picada de mosquitos do gênero *Aedes*, como as espécies *Aedes africanus*, *Aedes aegypti*, *Aedes hensilli*, *Aedes albopictus*, entre outras, sendo *Aedes aegyptii* a espécie de mosquito mais associada à transmissão (Dick et al., 1952; Duffy et al., 2009; Hayes, 2009). *Aedes*

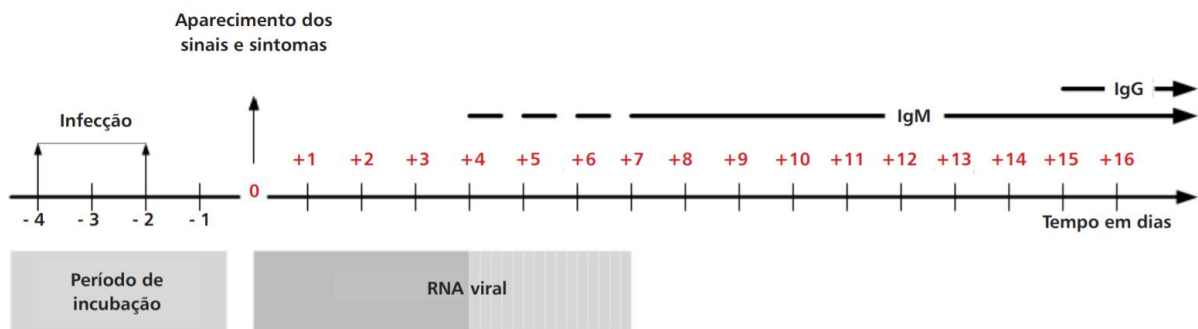
aegyptii tem uma distribuição ampla mundialmente, sendo comum especialmente em regiões tropicais e subtropicais (Kraemer et al., 2015).

Embora o principal modo de transmissão seja vetorial, outros meios de transmissão incluem via sexual, vertical, perinatal e transfusão sanguínea (Besnard et al., 2014; Martines et al., 2015; Barjas-Castro et al., 2016; Calvet et al., 2016; D'Ortenzio et al., 2016; Fréour et al., 2016). A transmissão vertical, ou seja, da gestante para o bebê durante a gestação, foi comprovada através da detecção do RNA viral no líquido amniótico de mães infectadas e no cérebro de fetos que foram a óbito (Martines et al., 2015; Calvet et al., 2016).

Diagnóstico da infecção

A avaliação clínica de pacientes em uma área de transmissão contínua do ZIKV é importante no diagnóstico, mas pode não ser suficiente dada a sobreposição clínica com outras infecções, como pelos vírus da dengue (DENV) e chikungunya (CHIKV) (Plourde & Bloch, 2016).

Os exames para o diagnóstico da infecção pelo ZIKV mais utilizados podem ser classificados em duas categorias: sorológicos e moleculares (Landry & George, 2017). Os exames sorológicos, que detectam os anticorpos IgM e IgG contra o ZIKV, são feitos geralmente através do teste rápido ou do teste ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), não sendo recomendados para a fase aguda da doença, mas sim para o período a partir do 7º dia do aparecimento dos sintomas (Figura 4) (Musso & Gubler, 2016; Landry & George, 2017). O exame sorológico possui como limitação a reação cruzada com outros flavivírus, em caso de pacientes previamente imunizados ou infectados (Musso & Gubler, 2016; Landry & George, 2017). A transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR), em contrapartida, é um exame molecular considerado como preferível e mais específico para a detecção do vírus na fase aguda da doença (Musso & Gubler, 2016; Landry & George, 2017). Este exame detecta o material genético do vírus e precisa ser realizado em um período específico (<7 dias a partir do início dos sintomas) (Figura 4) (Musso & Gubler, 2016).



Diagnóstico laboratorial por RT-PCR e Sorologia (IgM e IgG) para Zika vírus.

Figura 5. Período ideal para o diagnóstico da infecção pelo ZIKV através de RT-PCR e ou sorologia. Adaptado de: Brasil, 2015 (b).

O sangue é a amostra padrão para a realização dos exames, mas saliva e urina são amostras alternativas (Landry & George, 2017). Para a confirmação da infecção congênita, amostras de líquido amniótico, placenta, cordão umbilical e líquido cefalorraquidiano podem ser utilizadas (Landry & George, 2017). A análise de imunohistoquímica, com anticorpos monoclonais, para detecção do antígeno do ZIKV tem sido aplicada para a análise de tecidos de autópsia (Musso & Gubler, 2016).

Complicações associadas à infecção pelo vírus Zika

Até o surto na Polinésia Francesa, a infecção pelo ZIKV era considerada uma doença leve (Oehler et al., 2013). No entanto, a caracterização da sintomatologia da doença foi feita a partir de pequenos surtos em populações pequenas, com um número limitado de casos infectados (Musso & Gubler, 2016). A partir dos surtos de infecções pelo vírus que ocorrem na Polinésia Francesa em 2013 e no Brasil em 2015, duas complicações mais sérias relacionadas com a infecção pelo ZIKV foram descobertas (Oehler et al., 2013; Campos et al., 2015; Schuler-Faccini et al., 2016; Watrin et al., 2016).

A experiência na Polinésia Francesa levou à descoberta de uma importante complicação neurológica relacionada à infecção pelo ZIKV, a Síndrome de Guillain-Barré (Oehler et al., 2013). Foi demonstrado que durante o surto de ZIKV na Polinésia

Francesa em 2013, houve um aumento da incidência de uma doença autoimune grave que afeta o sistema nervoso, a Síndrome de Guillain-Barré (GBS), sugerindo a ligação da infecção pelo ZIKV com essa doença (Cao-Lormeau et al., 2016; Watrin et al., 2016). A incidência da GBS tem sido estimada como em torno de 1 a 3 casos por 100.000 habitantes ao ano (Sejvar et al., 2011). Na Polinésia Francesa, entre 2009 e 2012, cerca de 3 a 10 casos da doença foram relatados por ano, enquanto que apenas entre novembro de 2013 e fevereiro de 2014 durante a epidemia, o número de casos de GBS registrados foi de 42 (Cao-Lormeau et al., 2016; Watrin et al., 2016). Além da Polinésia Francesa, a GBS teve um aumento na sua frequência também no Brasil, em El Salvador e na Venezuela (Musso & Gubler, 2016).

O surto no Brasil, em contrapartida, levou a descoberta que o ZIKV era capaz de causar complicações neonatais (França et al., 2016; Kleber de Oliveira et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016). O ZIKV foi relatado como capaz de cruzar a barreira placentária e infectar embriões ou fetos em desenvolvimento e, além disso, em muitos casos, afetar o desenvolvimento destes embriões ou fetos, causando uma série de anomalias congênitas ou sua morte (França et al., 2016; Melo et al., 2016). Tal descoberta se deu a partir de setembro de 2015, quando relatos do aumento do número de crianças nascidas com microcefalia grave em áreas do Brasil com surto de infecções pelo ZIKV começaram a surgir (Kleber de Oliveira et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016). Estes relatos levantaram a hipótese de uma possível relação entre estes dois eventos, visto que nos anos anteriores a média de nascidos vivos com microcefalia no Brasil era 20 vezes menor que a registrada em 2015 (Marrs et al., 2016).

A detecção do vírus, RNA viral e antígenos nos tecidos cerebrais de casos com infecção congênita por ZIKV e tecidos placentários de abortos precoces foram achados que forneceram evidências da associação e casualidade entre a infecção pelo ZIKV e as anomalias que estavam sendo visualizadas nos bebês (Calvet et al., 2016; Martinez et al., 2016; Melo et al., 2016). Corroborando estes achados, estudos em modelos animais, como camundongos e galinhas, também encontraram danos nas células do sistema nervoso central dos fetos infectados pelo ZIKV, além de demonstrar a rota de

transmissão materno-fetal através da placenta e revelar o tropismo do vírus para células do córtex cerebral, incluindo células progenitoras neurais (Cugola et al., 2016; Goodfellow et al., 2016; Li et al., 2016; Miner et al., 2016; Wu et al., 2016).

Em 11 de novembro de 2015, o Ministério da Saúde declarou, através da Portaria Nº 1.813, Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) por alteração do padrão de ocorrência de microcefalias no Brasil (Ministério da Saúde, 2015). No dia 01 de fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde declarou a propagação contínua da doença causada por ZIKV na América Latina e no Caribe, de importância internacional em Saúde Pública (WHO, 2016b). A rápida disseminação do ZIKV nas Américas, sua associação com os milhares de casos de microcefalia e maiores taxas da síndrome de Guillain-Barré (GBS) foram determinantes para a declaração de Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional (WHO, 2016c). Ainda em 2016, após a avaliação de diversos casos e revisão de critérios, se confirmou o ZIKV como um novo teratogênico em humanos e responsável pelo aumento do número de casos de microcefalia no Brasil (França, et al., 2016; Nunes et al., 2016; Schuler-Faccini et al., 2016; WHO, 2016a).

Teratogênese do vírus Zika

Condições genéticas e agentes ou exposições ambientais capazes de afetar a expansão normal de células progenitoras neuronais, o tempo de sua diferenciação e a sobrevivência de sua progênie podem reduzir drasticamente o número final de células cerebrais, resultando em anormalidades no desenvolvimento do SNC (Abuelo, 2007; Ahmad et al., 2018).

Estudos *in vivo* e *in vitro* demonstraram que, ao infectar embriões ou fetos durante uma gestação, o ZIKV é neurotrópico; o vírus é capaz de cruzar a barreira placentária e posteriormente a barreira cerebral, infectando diferentes tipos de células neurais (Brault et al., 2016; Li et al., 2016; Schwartz, 2016; Wu et al., 2016; Tang et al., 2016; Garcez et al., 2017).

Estudos avaliando tecidos e células humanas e de modelos animais identificaram que o ZIKV infecta diferentes tipos de células neurais, como células

tronco neurais, células neuroprogenitoras, neurônios maduros e células da glia, sendo as células neuroprogenitoras seu principal alvo (Brault et al., 2016; Li et al., 2016; Wu et al., 201; Miner & Diamond). Além de células neurais, o vírus também pode infectar células da placenta, como células de Hofbauer, trofoblastos e células endoteliais; tecidos oculares, como a córnea, a retina e o nervo óptico; células do trato reprodutivo, como espermatogônias, células de Sertoli, células de Leydig e o epitélio vaginal; e pode estar presente em diversos fluidos corporais, como lágrimas, saliva, sêmen, muco cervical e urina (Miner & Diamond).

A infecção leva, além da resposta do sistema imune, a parada do ciclo celular, apoptose e inibição da proliferação e diferenciação de células progenitoras neuronais (Cugola et al., 2016; Li et al., 2016). Essa sequência disruptiva do neurodesenvolvimento do embrião ou do feto gera um quadro fenotípico atualmente denominado Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ) (França et al., 2016; del Campo et al., 2017).

Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika

A SCZ inclui um conjunto de anomalias congênitas e alterações no neurodesenvolvimento (Figura 5).

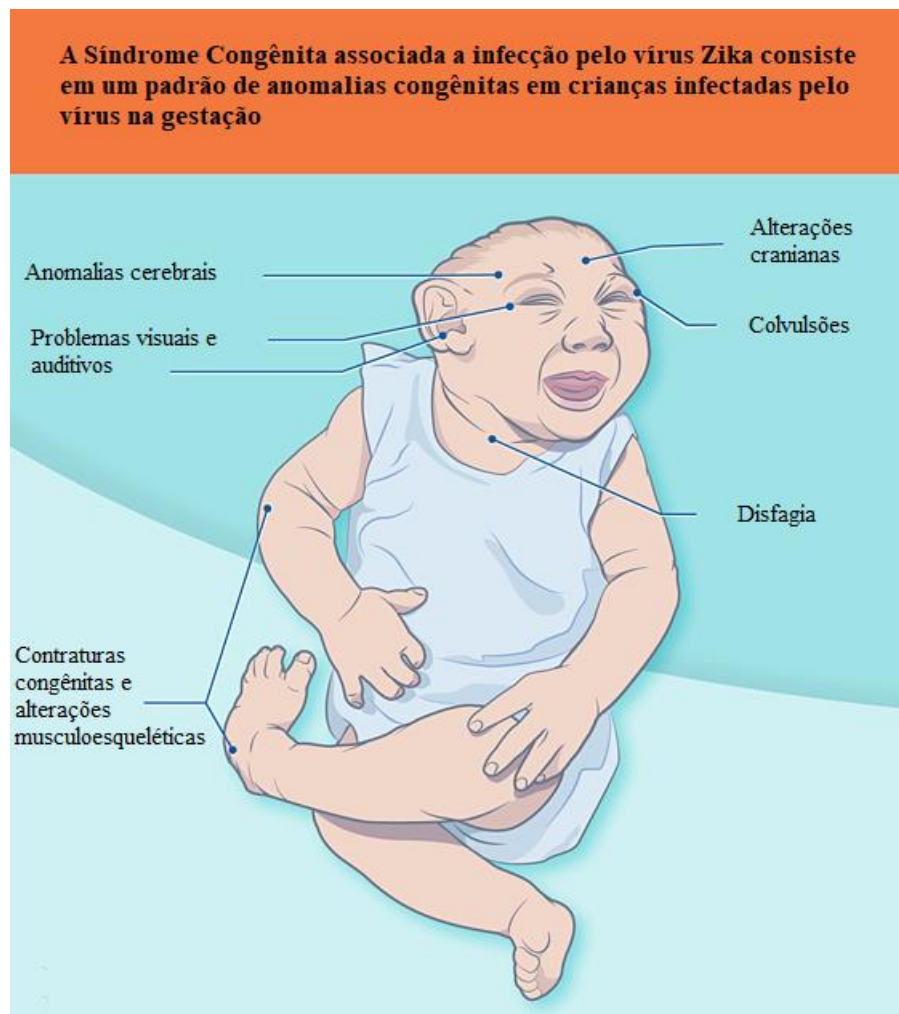


Figura 6. Principais anomalias congênicas presentes na Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika. Adaptada de CDC, 2017.

As alterações morfológicas no crânio são bastante características da SCZ, assim como anomalias cerebrais, anomalias oculares, contraturas congênicas e alterações neurológicas (Moore et al., 2018). As alterações visualizadas na SCZ são similares àquelas descritas na sequência disruptiva cerebral fetal, condição descrita já na década de 1980, que tinha como causa proposta as infecções pré-natais (Russel et al., 1984; Moore et al., 1990).

Dentre as alterações cranianas, é possível citar a microcefalia moderada (perímetro cefálico 2 desvios-padrão abaixo da média para determinada idade ou

sexo) ou grave (perímetro cefálico 3 desvio padrão abaixo da média), além de suturas cranianas sobrepostas, osso occipital proeminente, excesso de pele do couro cabeludo – associado a padrões de crescimento do cabelo anormais - e desproporção craniofacial, que gera características faciais de grandes dimensões (Cavalheiro et al., 2016; Del Campo et al., 2016; de Fatima Vasco Aragao et al., 2016; Microcephaly Epidemic Research Group, 2016).

As anomalias cerebrais são caracterizadas por calcificações intracranianas, ventriculomegalia, hidrocefalia, alteração ou ausência dos padrões de giros (lissencefalia), hipoplasia ou ausência do corpo caloso e hipoplasia cerebelar (Cavalheiro et al., 2016; Del Campo et al., 2016; de Fatima Vasco Aragao et al., 2016).

Entre as anomalias oculares, há maior prevalência das alterações estruturais, como microftalmia e coloboma, além de catarata e calcificações intraoculares (de Paula Freitas et al., 2016; Ventura et al., 2016). Achados menos comuns incluem atrofia coriorretiniana focal, manchas pigmentares na retina, e atrofia ou alterações do nervo óptico (de Paula Freitas et al., 2016; Ventura et al., 2016).

Contraturas congênitas, também chamadas de artrogripose congênita múltipla, ocorrem na SCZ e afetam uma ou múltiplas articulações (Del Campo et al., 2016; van der Linden et al., 2016). Tais contraturas podem variar em relação ao tipo (proximal ou distal), lateralidade, membro superior ou inferior e gravidade (van der Linden et al., 2016). Outras alterações musculoesqueléticas, como o pé torto congênito também são achados da SCZ (Del Campo et al., 2016; van der Linden et al., 2016; Serpa et al., 2019; Matos et al., 2020).

Como consequência destas anomalias no desenvolvimento do sistema nervoso central, as crianças com SCZ têm um neurodesenvolvimento pediátrico bastante comprometido, apresentando importantes deficiências cognitivas, de fala e motoras (Einspieler et al., 2019; Sobral da Silva et al., 2020; Wheeler et al., 2020). Além disso, apresentam comumente problemas auditivos, convulsões, disfagia e dificuldades de deglutição (Satterfield-Nash et al., 2017; van der Linden et al., 2018; Bertolli et al., 2020; Blackmon et al., 2020; Leal et al., 2020). Alterações cardíacas foram também relatadas nestas crianças (Cranston et al., 2020).

A ocorrência destas manifestações depende principalmente do período gestacional em que a mãe foi infectada por ZIKV, sendo que quanto mais precoce, mais graves são as anomalias do recém-nascido (Brasil et al., 2016; Del campo et al., 2017).

Um estudo recente brasileiro descreveu uma taxa de letalidade de aproximadamente 10% dos casos confirmados de SCZ, sendo 93% das mortes em menores de 1 ano – incluindo o período neonatal e pós-natal (N Costa et al., 2020). Dentre as principais causas de morte das crianças com SCZ estavam insuficiência respiratória do recém-nascido, septicemia e malformações congênitas não especificadas, representando cerca de 45% das causas de morte (N Costa et al., 2020). Um estudo avaliando a causa da morte de 22 crianças com SCZ que vieram a óbito em Pernambuco descreveu doenças pulmonares, incluindo pneumonia e sepse com aspiração pulmonar maciça, como causas de morte destas crianças, propondo tais causas como provavelmente secundárias à disfagia e refluxo (de Fatima Viana Vasco Aragão et al., 2019). Considerando as características apresentadas pelo recém-nascido, N Costa e colaboradores (2020) descreveram como variáveis associadas aos óbitos destas crianças com SCZ o peso ao nascer, a prematuridade, o índice do Apgar <7 no 1º e 5º minuto e presença de anomalias congênitas na criança (N Costa et al., 2020).

Modelos *in vivo* e *in vitro* de investigação da infecção e teratogênese do vírus Zika

A fim de melhor compreender os mecanismos de transmissão, entrada do ZIKV nas células, resposta imune do hospedeiro, mecanismos envolvidos com a patogênese e teratogênese do vírus, bem como possíveis tratamentos, diversos modelos *in vivo* e *in vitro* têm sido utilizados nas pesquisas (Kublin & Whitney, 2018; Pena et al., 2018).

Dentre os modelos *in vivo* (ou modelos animais) utilizados nas pesquisas estão os primatas não-humanos, como babuínos-anúbis (*Papio anubis*), macacos-de-cauda-de-porco-do-sul (*Macacca nemestrina*), macacos-rhesus (*Macacca mulatta*), e saguis

(*Callithrix jacchus*), porcos, ovelhas, camundongos, ratos, porquinhos-da-Índia, hamsters e embriões de galinha (Narasimhan et al., 2020).

Os camundongos não são naturalmente suscetíveis à infecção pelo ZIKV (Grant et al., 2016). Em outras espécies, a proteína não-estrutural NS5 do ZIKV é capaz de reconhecer e degradar a proteína STAT2 do hospedeiro, evitando a sinalização do interferon (IFN) e uma resposta imune inicial mais robusta do hospedeiro, permitindo assim a replicação do vírus (Grant et al., 2016). No entanto, em camundongos este processo não ocorre e, por isto, há um controle eficiente da replicação viral e ausência da doença (Grant et al., 2016). Desta forma, estudos que utilizam este modelo animal precisam usar linhagens imunocomprometidas ou vias alternativas de inoculação viral, como diretamente no cérebro, por exemplo (Morrison et al., 2017; Narasimhan et al., 2020).

Modelos *in vitro* têm sido também amplamente utilizados em pesquisas para as mesmas finalidades citadas para os modelos animais. Dentre os tipos celulares mais estudados, em função do neurotropismo do ZIKV e por representarem o momento do desenvolvimento neural, estão as células-tronco pluripotente induzidas (iPS – do inglês *induced pluripotent stem cells*) e células neuroprogenitoras (Kublin & Whitney, 2018; Pena et al., 2018). Além de cultura de células bidimensionais (2D), modelos de cultura celular em 3D que modelam o desenvolvimento do cérebro – neuroesferas e organóides celulares – formados por células-tronco pluripotente induzidas também têm sido bastante utilizados nas pesquisas (Kublin & Whitney, 2018; Pena et al., 2018).

Embora estes modelos sejam heterogêneos e apresentem algumas limitações, as informações obtidas através destes estudos podem ser comparadas e agregadas, fornecendo importantes descobertas sobre a biologia do ZIKV.

Mecanismos moleculares associados à infecção e teratogênese do vírus Zika

Muitos estudos têm buscado entender os mecanismos de infecção e teratogênese do ZIKV através de análises moleculares (Dang et al., 2016; Li et al., 2016; Nowakowski et al., 2016; Rolfe et al., 2016; Tang et al., 2016; Zhang et al., 2016; Garcez et al., 2017; Tiwari et al., 2017; Yi et al., 2017; Caires-Júnior et al., 2018;

Janssens et al., 2018). Tal estratégia gera diferentes hipóteses acerca de vias que podem explicar a suscetibilidade diferencial dos indivíduos para o desenvolvimento das anomalias congênitas visualizadas na SCZ.

Os principais mecanismos ou alterações moleculares avaliados e discutidos como associados à teratogênese do ZIKV, os quais são excelentes candidatos para a investigação da suscetibilidade genética dos indivíduos à teratogênese do vírus, são: (1) mecanismos de entrada do ZIKV nas células, (2) mecanismos de resposta imune do hospedeiro à infecção, (3) alterações no ciclo celular e indução à morte celular e (4) alterações na expressão de genes e proteínas relacionados à neurogênese e neurodesenvolvimento (Faizan et al., 2016; Wang et al., 2017; Ojha et al., 2018; Christian et al., 2019).

Entrada do vírus Zika nas células

A entrada do ZIKV nas células se dá, principalmente, através de receptores de superfície, incluindo os receptores de lectina tipo C (CLRs), como o DC-SIGN (*Dendritic Cell-Specific Intercellular adhesion molecule-3-Grabbing Non-integrin*) ou receptores de lipídios celulares (que reconhecem lipídios na membrana viral), como o receptor TIM-1 - integrantes da família TIM, e os receptores TYRO3, AXL e MER integrantes da família TAM (receptores de tirosina quinase), entre outros (Nowakowski et al., 2016; Agrelli et al., 2019). Dependendo do tipo celular, os receptores de entrada também podem variar (Agrelli et al., 2019).

O receptor AXL é o mais estudado em relação à infecção pelo ZIKV (Nowakowski et al., 2016; Meertens et al., 2017; Richard et al., 2017; Chen et al., 2018; Strange et al., 2019). Sabe-se que AXL é superexpresso em células cerebrais humanas durante o desenvolvimento, incluindo células progenitoras neurais, células da glia, microglia, astrócitos e células endoteliais, as quais são exatamente os principais alvos do ZIKV (Nowakowski et al., 2016; Meertens et al., 2017; Richard et al., 2017; Chen et al., 2018; Strange et al., 2019). A expressão específica de AXL fornece uma entrada fácil para infecção viral quando populações de células

hospedeiras que expressam esse receptor são expostas ao ZIKV. A exposição de células ao anticorpo contra AXL ou o silenciamento de AXL usando pequenos RNA de interferência levaram a uma diminuição na replicação viral e infecção, sugerindo o importante papel de AXL como um receptor de entrada de ZIKV (Hamel et al., 2015; Meertens et al., 2017). A entrada do ZIKV através de AXL estimula vias de sinalização mediadas por AXL, as quais suprimem a resposta imune inata (Hamel et al., 2015).

Resultados de estudos em modelos animais indicam que os receptores de entrada candidatos, AXL, MERTK e TYRO3, não são criticamente essenciais para a entrada e infecção do ZIKV, visto que o nocaute destes receptores não previne a infecção (Wells et al., 2016; Hastings et al., 2017 Wang et al., 2017).

Resposta imune do hospedeiro

Ao infectar as células, o ZIKV induz uma resposta imune e a expressão de genes antivirais no hospedeiro (da Silva et al., 2019; Liu et al., 2019; Xu et al., 2019). Comumente na resposta a uma infecção viral, componentes virais específicos, como o genoma viral, são reconhecidos e então ocorre a produção de interferon tipo I (IFN-I) e citocinas pró-inflamatórias (Thompson et al., 2011). O reconhecimento de componentes virais ocorre através de receptores Toll-like, sendo no caso do ZIKV especialmente o TLR3, a partir de então, genes estimulados por interferon (ISGs), como os genes *OAS2*, *ISG15*, *MX1*, entre outros, são então expressos (Hamel et al., 2015; Li et al., 2016; Dang et al., 2016; Liao et al., 2020; Ojha et al., 2019; Wang et al., 2020).

A via de sinalização de TLR3 é ativada por meio da detecção do RNA viral do ZIKV e faz parte da resposta imune inata, gerando uma resposta antiviral nas células infectadas (Dang et al., 2016). Estudos *in vitro* têm demonstrado que a ativação da via de TLR3 em células infectadas causa a perturbação de diversos genes relacionados com o neurodesenvolvimento, sendo proposto que a hiperativação da resposta imune inata causaria esta desregulação dos genes relacionados à neurogênese,

prejudicando tal processo (Dang et al., 2016; Faizan et al., 2016; Li et al., 2016). Em células neuroprogenitoras, a inibição de TLR3 foi capaz de reduzir os efeitos fenotípicos da infecção por ZIKV, incluindo a desregulação do ciclo celular e morte celular (Dang et al., 2016).

Estudos têm demonstrado que o ZIKV é capaz de modular tanto o sistema imune inato quanto adaptativo do hospedeiro (Winkler et al., 2017). O mecanismo pelo qual o ZIKV evade o sistema imune do hospedeiro é descrito como sendo relacionado às suas proteínas não estruturais (NS), que atuam restringindo as respostas antivirais e facilitando a replicação viral (Wu et al., 2017). A proteína NS5 do vírus, por exemplo, atua na degradação de STAT2, uma proteína fundamental para a sinalização de IFN-I (Grant et al., 2016; Dar et al., 2017; Wang et al., 2020). As proteínas virais NS1, NS4B e a proteína NS2B, em conjunto com NS3, inibem a expressão de IFN-I e, conseqüentemente, favorecem o aumento da replicação viral (Wu et al., 2017).

Estudos moleculares *in vivo* demonstraram que, durante a infecção, os genes mais enriquecidos no cérebro foram aqueles associados à resposta imune e produção ou resposta às citocinas (Li et al., 2016; Shao et al., 2016). Dentre os genes de resposta imune é possível destacar as interleucinas, interferons do tipo I, o fator de necrose tumoral (TNF-alfa), o ligante 10 de quimiocina com motivo CXC (CXCL10) e TLR3 (Li et al., 2016; Shao et al., 2016; Nem de Oliveira Souza et al., 2018). Da mesma forma que com TLR3, estudos *in vivo* demonstraram que a inibição de TNF-alfa preveniu a ocorrência alterações neurológicas nos animais expostos ao ZIKV, como convulsões, por exemplo (Nem de Oliveira Souza et al., 2018).

Alterações moleculares em genes relacionados à resposta imune também têm sido descritas através estudos *in vitro*, sendo os genes desta via os mais afetados em estudos de expressão gênica (Tiwari et al., 2017; Amaral et al., 2020; Gratton et al., 2020).

O ZIKV também induz a neuroinflamação, processo já sabidamente relacionado com distúrbios neurológicos (Khaiboullina et al., 2017; Lum et al., 2017). Neste

contexto, tais evidências sugerem que tanto o mecanismo de resposta imune exacerbada, quanto a neuroinflamação, desempenham um papel crítico na patogênese da infecção pelo ZIKV, afetando a neurogênese e induzindo a morte celular.

Alterações do ciclo celular e indução à apoptose

Estudos moleculares *in vitro* também demonstraram que a infecção pelo ZIKV altera a expressão de diversos genes envolvidos na regulação do ciclo celular, bem como induz a expressão de genes relacionados com a apoptose, sendo este mais um mecanismo sugerido como associado às malformações neurológicas presentes nos indivíduos com a SCZ (Zhang et al., 2016; Li et al., 2016; Devhare et al., 2017; Garcez et al., 2017; Ghouzzi et al., 2017; Hammack et al., 2019; Gratton et al., 2020; Yang et al., 2020).

A desregulação do ciclo celular e consequente redução na proliferação das células neurais, especialmente das células neuroprogenitoras, foi demonstrada afetar a neurogênese como um todo (Zhang et al., 2016; Devhare et al., 2017; Garcez et al., 2017; Ghouzzi et al., 2017).

Diversos estudos demonstraram também que células infectadas pelo ZIKV apresentam expressão do gene supressor tumoral *TP53*, responsável pela estímulo da apoptose celular, bem de outros genes da via de p53 (Zhang et al., 2016; Devhare et al., 2017; Ghouzzi et al., 2017; Slomnicki et al., 2017). Teng e colaboradores (2017), descreveram, a partir de um estudo de biologia de sistemas *in silico*, que a provável interação entre a proteína do capsídeo do vírus e MDM2, um regulador negativo de *TP53*, poderia ser um dos mecanismos associado ao aumento da apoptose celular, em função da maior atividade de p53 (Teng et al., 2017). Coerentemente, estudos demonstraram que a inibição de p53 suprimia de forma eficiente a morte induzida pelo ZIKV nas células neuroprogenitoras (Zhang et al., 2016; Slomnicki et al., 2017).

Impacto nos processos de neurodesenvolvimento

As alterações moleculares associadas à resposta imune e inflamatória do hospedeiro e àquelas relacionadas ao ciclo celular e apoptose podem afetar a expressão de genes envolvidos no neurodesenvolvimento. Considerando o impacto destas alterações moleculares citadas e do próprio ZIKV nas células neurais, estudos *in vivo* e *in vitro* têm demonstrado também a diminuição da expressão de miRNAs, genes e proteínas associadas a processos do neurodesenvolvimento, como proliferação e diferenciação de células neurais, neurogênese e migração neuronal (Yi et al., 2017; Azouz et al., 2019; Castro et al., 2019; Dang et al., 2019; Islam et al., 2019; Aguiar et al., 2020; Tabari et al., 2020).

Estudos avaliando a metilação gênica após a infecção pelo ZIKV, *in vitro* ou a partir de amostras de crianças expostas ao ZIKV na gestação, demonstraram que genes envolvidos com o desenvolvimento do cérebro ou responsáveis pelo desenvolvimento de microcefalia e desordens neuropsiquiátricas foram diferencialmente metilados (Janssens et al., 2018; Anderson et al., 2020).

A infecção pelo ZIKV ou, mais especificamente, as proteínas não estruturais NS4A e NS4B do vírus inibe a sinalização da via Akt-mTOR, uma via envolvida na autofagia, que também é essencial para o desenvolvimento do cérebro (Liang et al., 2016). Desta forma, o ZIKV induz uma ativação aberrante da autofagia e, através deste outro mecanismo, prejudica a neurogênese (Liang et al., 2016). Um estudo avaliando células progenitoras neurais de bebês com SCZ, demonstrou também diferenças significativas na expressão de genes reguladores da via mTOR e com papel na autofagia, discutindo o impacto que estas alterações tiveram no desenvolvimento da SCZ nas crianças (Caires-Júnior et al., 2018).

Além da alteração na neurogênese, estudos em modelos animais infectados pelo ZIKV têm demonstrado a alteração, especialmente a diminuição, da expressão de genes envolvidos em outros processos do neurodesenvolvimento, como a gliogênese, diferenciação e migração de células gliais e oligodendrogênese (Li et al., 2018).

A Síndrome Congênita Associada à Infecção pelo Vírus Zika como uma fenocópia de síndromes genéticas

O conceito de fenocópia foi proposto por Goldschmidt (1935) (Lenz, 1973). Uma fenocópia consiste em uma ou mais anomalias congênitas causadas devido à exposição a fatores ambientais, como medicamentos ou agentes biológicos teratogênicos, por exemplo, mas que são muito similares do ponto de vista fenotípico a anomalias causadas devido a uma mutação genética (Lenz, 1973; Cassina et al., 2017).

Alguns estudos têm descrito e discutido alterações moleculares devido à infecção pelo ZIKV que se enquadrariam neste conceito de fenocópia. Tem sido descrito, por exemplo, que a infecção pelo ZIKV em células neuroprogenitoras, entre outras células neurais, afeta a expressão e metilação gênica de genes que geralmente quando mutados ocasionam fenótipos visualizados na SCZ, como microcefalia (Anderson et al., 2016; Ghouzzi et al., 2016; Li et al., 2016).

Sabe-se que muitas proteínas associadas com a ocorrência de microcefalia atuam em processos de organização celular para a ocorrência da mitose, como formação do fuso, entre outros (Marthiens et al., 2013). E, neste sentido, estudos em células neuroprogenitoras e organoides cerebrais demonstraram que o ZIKV afeta estes mesmos processos, afetando assim a proliferação das células neurais e levando à morte celular (Onorati et al., 2016; Souza et al., 2016; Gabriel et al., 2017).

SUSCETIBILIDADE NA TERATOGENESE

Uma vez que nenhum teratígeno é capaz de causar anomalias congênitas em 100% dos indivíduos expostos, o percentual de indivíduos afetados pode variar dependendo de diferentes variáveis (Wilson et al., 1977; Polifka e Friedman, 2002). A suscetibilidade genética de um indivíduo para danos induzidos por teratógenos, por exemplo, é um dos princípios da teratogênese (Wilson et al., 1977). Neste sentido,

estudos avaliando genes específicos têm sido conduzidos e têm encontrado variantes genéticas que conferem maior susceptibilidade de um indivíduo em relação ao dano induzido por um teratígeno (Wlodarczyk et al., 2011; Cassina et al., 2012).

Fatores de risco genéticos e ambientais na teratogênese do vírus Zika

Alguns estudos têm buscado entender qual o risco de desenvolvimento da SCZ em crianças expostas ao vírus durante a gestação. No entanto, não é possível saber com precisão qual o percentual de crianças expostas ao ZIKV que desenvolvem anomalias congênitas, pois uma parcela grande de indivíduos infectados (80%), dentre os quais gestantes, não desenvolvem sintomas (Duffy et al., 2019). Desta forma, muitas estimativas sobre esta quantidade de crianças que nascem com anomalias congênitas após a exposição são feitas apenas com base em grupos de gestantes sintomáticas e/ou com soropositivas para a infecção.

Em um estudo prospectivo de Brasil e colaboradores (2016) com 117 nascidos vivos filhos de 116 gestantes soropositivas para o ZIKV, foi observado que em torno de 42% dos recém-nascidos apresentavam alguma anomalia congênita e 7% vieram a óbito (Brasil et al., 2016). Estudos de revisão, em contrapartida, estimam como sendo até 30% ou até 42% o risco de crianças expostas ao ZIKV na gestação apresentarem algum efeito adverso ou anomalia congênita (Pomar et al., 2019; Vhp et al., 2020). Como previamente mencionado, dado o grupo amostral comumente utilizado nestes estudos, é possível que este risco seja um pouco menor do que o que vem sendo estimado.

Poucos estudos até o momento investigaram variações genéticas em mães de crianças que desenvolveram a SCZ ou nas próprias crianças. Rossi e colaboradores (2019), avaliando 52 mães soropositivas para a infecção pelo ZIKV que tiveram ou não filhos com SCZ, descreveram os polimorfismos c.319T>C (rs11676272) e c.1297G>A, nos genes *ADCY3* e *ADCY7*, respectivamente, como associados a maior risco de desenvolvimento de SCZ (Rossi et al., 2019). Ainda, Santos e colaboradores (2019) descreveram, a partir de uma amostra de 68 mães expostas ao ZIKV que tiveram filhos com SCZ e 43 mães expostas ao ZIKV que tiveram filhos normais, que o polimorfismo

rs3775291 em *TLR3* foi associado a maior risco de ocorrência da SCZ (Santos et al., 2019).

Considerando estudos que avaliaram variações genéticas nas crianças com SCZ, Santos e colaboradores (2019) também descreveram, a partir de uma amostra de 42 crianças com SCZ e microcefalia grave e 17 crianças com SCZ e microcefalia moderada, uma associação entre o polimorfismo rs1799964 de *TNF* e o fenótipo de microcefalia grave nestas crianças com CZS (Santos et al., 2019). Outros dois estudos, avaliando crianças com SCZ através de exomas completos foram conduzidos. Caires-Júnior e colaboradores (2018) realizaram o sequenciamento de exoma de 18 crianças com a SCZ e 5 crianças expostas ao ZIKV que nasceram normais, mas não encontraram nenhuma variante específica que pudesse conferir maior suscetibilidade para o desenvolvimento da SCZ, tendo descrito apenas a presença de um número maior de variantes raras nas crianças com a SCZ (Caires-Júnior et al., 2018). Aguiar e colaboradores (2020) realizaram o sequenciamento de exoma de 8 crianças com a SCZ e também citaram a presença de variantes raras em 5 destes indivíduos (Aguiar et al., 2020). No entanto, os autores deste estudo descreveram que combinando variantes presentes no mesmo gene, eles identificaram em cinco crianças da amostra 23 genes que possuíam pelo menos um polimorfismo, sendo tais genes relacionados à organização da matriz extracelular (genes que codificam colágeno, *FBN2*, *FBN3* e *FN1*), relacionados ao desenvolvimento do SNC (*PTPRZ1*), o sistema imunológico (*C7*, *C8A*, *IL4R*, *IL7*, *IRF3* e *TLR2*), contração muscular e artrogripose (*PIEZO2*, *RYR1* e *TTN*) e vias de sinalização Notch e Wnt (*NOTCH3*, *NOTCH4* e *VANGL1*).

Além de fatores genéticos, diversos estudos têm discutido algumas condições ambientais que podem favorecer o desenvolvimento da SCZ. O momento da gestação que ocorre a infecção pelo vírus, a condição nutricional da gestante e infecções ou imunizações prévias para outros flavivírus, como os vírus da dengue e da febre amarela, por exemplo, têm sido estudados como fatores ambientais que podem favorecer o desenvolvimento da SCZ (De Góes Cavalcanti et al., 2016; Masel et al., 2019; Barbeito-Andrés et al., 2020; Mendes et al., 2020; Radaelli et al., 2020).

CAPÍTULO II

JUSTIFICATIVA

JUSTIFICATIVA

O vírus Zika (ZIKV) é um agente infeccioso cuja capacidade teratogênica foi descoberta há cerca de 6 anos. A exposição ao vírus durante a gestação foi demonstrada como capaz de prejudicar o neurodesenvolvimento, produzindo anomalias congênitas e alterações neurológicas nos indivíduos expostos, as quais compõem a Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ). No entanto, sabe-se que apenas uma parcela dos indivíduos expostos desenvolve alterações, em torno de 1-42%.

Os mecanismos associados com a teratogênese do ZIKV são ainda pouco conhecidos. Estudos vêm demonstrando que a infecção de células neurais pelo ZIKV afeta a expressão e a metilação de diversos genes importantes em vias biológicas, como as vias de resposta imune, ciclo celular, neurodesenvolvimento, entre outras. As alterações moleculares e, conseqüentemente, desregulação destas vias têm sido sugeridas como responsáveis pelo desenvolvimento da SCZ.

A fim de melhor compreender as principais vias biológicas e genes afetados pelo ZIKV, estudos de revisão sistemática e meta-análises dos achados que vêm sendo divulgados na literatura são extremamente importantes, uma vez que comparam resultados, discutem a qualidade dos mesmos e geram novas hipóteses.

Sabe-se ainda que no caso de outros teratógenos, variações genéticas podem influenciar a suscetibilidade diferencial de um indivíduo em relação ao dano induzido. No entanto, para o ZIKV, alterações genéticas nos indivíduos expostos que nasceram com a SCZ ou que nasceram normais não têm sido ainda amplamente avaliadas. Assim, questões importantes sobre a infecção e teratogênese do ZIKV ainda não estão respondidas, tais como: Existe algum perfil genético associado com a suscetibilidade à teratogênese do vírus Zika ou com fenótipos específicos dentro da Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika?

Neste sentido, a avaliação da presença de variantes relacionadas a perfis genéticos desfavoráveis nas vias que têm sido descritas como mais desreguladas devido à infecção pelo ZIKV poderia auxiliar no entendimento, ao menos em parte, de por que alguns indivíduos desenvolvem a SCZ enquanto outros não. Cabe salientar

que é tais variantes de risco não seriam suficientes para causar uma anomalia congênita, considerando o desenvolvimento normal, porém, na presença da exposição ao ZIKV, elas teriam seu efeito potencializado.

A investigação das hipóteses e questões acima citadas, através de diferentes metodologias e abordagens investigativas, pode preencher muitas lacunas no conhecimento, bem como favorecer a identificação de genes e vias biológicas chaves na teratogênese do ZIKV.

CAPÍTULO III

OBJETIVOS

Objetivo Geral

Avaliar os mecanismos moleculares associados com a teratogenicidade do vírus Zika.

Objetivos Específicos

1. Realizar uma revisão sistemática, com base em estudos *in vivo*, e descrever as principais vias biológicas afetadas devido à infecção pelo ZIKV e mecanismos moleculares associados à sua teratogênese;
2. Realizar uma meta-análise, com base em estudos *in vitro* com células neurais, e identificar os principais genes e vias biológicas afetados devido à infecção pelo ZIKV e seu possível papel no fenótipo da SCZ;
3. Investigar variantes genéticas de possível suscetibilidade à SCZ em genes de entrada viral e resposta imune do hospedeiro em indivíduos com SCZ, comparando com indivíduos não afetados por anomalias congênitas que também foram expostos ao vírus;
4. Investigar variantes genéticas de possível suscetibilidade à SCZ em genes reguladores de ciclo celular em indivíduos com SCZ, comparando com indivíduos não afetados por anomalias congênitas que também foram expostos ao vírus;
5. Investigar variantes genéticas de possível suscetibilidade à SCZ em genes envolvidos com o neurodesenvolvimento em indivíduos com SCZ, comparando com indivíduos não afetados por anomalias congênitas que também foram expostos ao vírus;
6. Investigar variantes genéticas nas porções codificantes do genoma de gêmeos dizigóticos discordantes para a SCZ, a fim de identificar aquelas que possam explicar a suscetibilidade à teratogênese do ZIKV;
7. Investigar variantes genéticas nas porções codificantes do genoma de crianças comprovadamente expostas ao ZIKV com SCZ, comparando com crianças sem comprovação de exposição ao vírus com fenótipo compatível com a SCZ, a fim

de identificar variantes que sejam compartilhadas entre eles e possam representar marcadores de suscetibilidade para o desenvolvimento da SCZ;

8. Com base em uma revisão da literatura, descrever a possível relação entre a infecção pelo ZIKV na gestação, a resposta imune da mãe e o desenvolvimento de autismo em crianças expostas ao ZIKV.

PARTE I - Análises de expressão gênica diferencial

CAPÍTULO IV

Artigo 1

Molecular Mechanisms of ZIKV-induced Teratogenesis: A Systematic Review of
Studies in Animal Models

Submetido na Frontiers in Neuroscience

CAPÍTULO V

Artigo 2

Downregulation of microcephaly-causing genes can induce Congenital Zika
Syndrome: A Meta-analysis of RNA-Seq studies

Em preparação - A ser submetido na International Journal of Molecular Sciences

PARTE II - Análises de suscetibilidade genética para a teratogênese do ZIKV

CAPÍTULO VI

Artigo 3

AXL, TLR3 and STAT2: a genetic and systems biology investigation regarding their impact on the Congenital Zika Syndrome

Em preparação - A ser submetido na Journal of Microbiology, Immunology and Infection

CAPÍTULO VII







Artigo 4

Association between genetic variants in *NOS2* and *TNF* genes with Congenital ZIKV Syndrome and severe microcephaly

Publicado na Viruses

Article

Association between Genetic Variants in *NOS2* and *TNF* Genes with Congenital Zika Syndrome and Severe Microcephaly

Julia A. Gomes ^{1,2,3,4,*}, Eduarda Sgarioni ¹, Juliano A. Boquett ^{1,3}, Ana Cláudia P. Terças-Trettel ⁵, Juliana H. da Silva ⁶, Bethânia F. R. Ribeiro ⁷, Marcial F. Galera ⁸, Thalita M. de Oliveira ⁹, Maria Denise F. Carvalho de Andrade ¹⁰, Isabella F. Carvalho ¹¹, Lavínia Schüler-Faccini ^{1,2,3} and Fernanda S. L. Vianna ^{1,2,3,4,12,*}

- ¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Departamento de Genética, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 91501-970, Brazil; eduarda.sgarioni@hotmail.com (E.S.); julianob9@hotmail.com (J.A.B.); lavinia.faccini@gmail.com (L.S.-F.)
 - ² Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos (SIAT), Serviço de Genética Médica (SGM), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre 90035-903, Brazil
 - ³ Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Porto Alegre 90035-004, Brazil
 - ⁴ Laboratório de Medicina Genômica (LMG), Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre 90035-903, Brazil
 - ⁵ Departamento de Enfermagem, Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Tangará da Serra 78300-000, Brazil; enfanacnp@gmail.com
 - ⁶ Secretaria Municipal de Saúde de Tangará da Serra, Tangará da Serra 78300-000, Brazil; epidemio@tangaradaserra.mt.gov.br
 - ⁷ Fundação Hospital de Clínicas do Acre (FUNDACRE), Rio Branco 69914-220, Brazil; bfrdrigues@gmail.com
 - ⁸ Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá 78048-902, Brazil; fgalera@uol.com.br
 - ⁹ Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH), Cuiabá 78048-902, Brazil; thalitamar@yahoo.com.br
 - ¹⁰ Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza 60741-000, Brazil; dra.denisecarvalho@gmail.com
 - ¹¹ Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza 60811-020, Brazil; draisabellacarvalho@gmail.com
 - ¹² Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre 91501-970, Brazil
- * Correspondence: juuliadoamaral@gmail.com (J.A.G.); fslvianna@gmail.com (F.S.L.V.); Tel.: +55-51-3308-6722 (J.A.G.); +55-51-3308-6722 (F.S.L.V.)



Citation: Gomes, J.A.; Sgarioni, E.; Boquett, J.A.; Terças-Trettel, A.C.P.; da Silva, J.H.; Ribeiro, B.F.R.; Galera, M.F.; de Oliveira, T.M.; Carvalho de Andrade, M.D.F.; Carvalho, I.F.; et al. Association between Genetic Variants in *NOS2* and *TNF* Genes with Congenital Zika Syndrome and Severe Microcephaly. *Viruses* **2021**, *13*, 325. <https://doi.org/10.3390/v13020325>

Academic Editor:
Luis Martinez-Sobrido

Received: 19 January 2021
Accepted: 14 February 2021
Published: 20 February 2021

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.



Copyright: © 2021 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).

Abstract: Zika virus (ZIKV) causes Congenital Zika Syndrome (CZS) in individuals exposed prenatally. Here, we investigated polymorphisms in *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS3*, *TNF*, and *NOS2* genes as risk factors to CZS. Forty children with CZS and forty-eight children who were in utero exposed to ZIKV infection, but born without congenital anomalies, were evaluated. Children with CZS were predominantly infected by ZIKV in the first trimester ($p < 0.001$) and had mothers with lower educational level ($p < 0.001$) and family income ($p < 0.001$). We found higher risk of CZS due the allele rs2297518[A] of *NOS2* (OR = 2.28, CI 95% 1.17–4.50, $p = 0.015$). T allele and TT/CT genotypes of the *TNF* rs1799724 and haplotypes associated with higher expression of *TNF* were more prevalent in children with CZS and severe microcephaly ($p = 0.029$, $p = 0.041$ and $p = 0.030$, respectively). Our findings showed higher risk of CZS due ZIKV infection in the first trimester and suggested that polymorphisms in *NOS2* and *TNF* genes affect the risk of CZS and severe microcephaly.

Keywords: maternal exposure; Zika virus; Zika virus infection; teratogens; congenital abnormalities; genetic variation; genetic polymorphism; disease susceptibility; inflammation

1. Introduction

Zika virus (ZIKV) is a human teratogen capable of causing neurological and ocular malformations in fetuses with in utero exposure to ZIKV infection [1,2]. Congenital Zika

Syndrome (CZS) does not occur in all embryos or fetuses exposed, but in less than 42% [3,4]. The congenital anomalies present in children with CZS include brain calcifications, microcephaly, joint abnormalities, and ocular abnormalities, among others [4].

In order to understand the mechanisms associated with the development of congenital anomalies due to ZIKV infection, environmental and molecular variables have been investigated in humans, in vivo and in vitro; however, risk and protection factors still need to be better elucidated. The timing of ZIKV infection during pregnancy, for example, is a variable that has been discussed in studies as relevant to the occurrence and severity of congenital anomalies [5,6]. The investigation of molecular changes caused by ZIKV during infection, such as in the gene expression, is one approach used to understand its molecular mechanisms and factors associated with its teratogenesis. Studies in this context have shown an exacerbated activity of genes/proteins involved in the immune and inflammatory response during ZIKV infection [7–10].

It has been reported that some genes, such as *TNF*, *NOS2*, *PTGS2*, and *VEGFA*, as well as their proteins, are overexpressed during ZIKV infection, acting on the inflammatory response mechanism [11–14]. This neuroinflammatory profile in the central nervous system has been suggested as impairing the cell differentiation and proliferation—especially of neuroprogenitor cells—inducing the CZS [10–12]. The inefficient immune response as well as a highly inflammatory environment are, therefore, harmful scenarios for the developing brain, probably related to the increased cell death associated with the CZS development. Based on these data, the investigation of genes that act in this pathway and in developmental process, such as *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS3*, *TNF*, and *NOS2*, as well as functional polymorphisms that affect the expression of these genes and their proteins activity may lead to the discovery of genetic factors of susceptibility to teratogenesis of ZIKV.

Hence, the aim of this study was to assess environmental variables, such as sociodemographic and clinical characteristics, as well as genetic variants in genes involved in the inflammatory process of response to ZIKV as risk or protective factors for CZS. Therefore, we investigated a sample of children who were in utero exposed to ZIKV infection and later developed CZS or, some of them, were born without congenital anomalies.

2. Materials and Methods

2.1. Ethical Issues

This study was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, the institution responsible for this study (n° 170619–CAAE 78735817910015327), and by all participating institutions. All legal guardians of individuals recruited for this study gave their informed consent for inclusion before they participated in the study.

2.2. Sample

In this case-control study, we included 40 children diagnosed with CZS whose mothers had evidence of ZIKV infection during pregnancy (case group) and 48 children without congenital anomalies whose mothers also had evidence of ZIKV infection (control group). Evidence of ZIKV exposure was defined as positive RT-PCR or specific symptoms of infection ZIKV during a ZIKV outbreak in the region during the pregnancy (e.g., rash, fever and/or joint pain). Case children were recruited between June 2018 to November 2019 from reports of microcephaly in five Brazilian research and/or assistance centers: North region (Fundação Hospital do Acre, $n = 4$), Northeast region (Fundação Universidade Estadual do Ceará, $n = 21$), Midwest region (Universidade do Estado de Mato Grosso, $n = 2$ and Universitário Júlio Muller, $n = 12$), and South region (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, $n = 1$). Control children were recruited in the same research and/or assistance centers from the North region ($n = 1$), Midwest ($n = 46$, from a cohort of women that gave birth in 2016, in the city of Tangará da Serra), and South region ($n = 1$).

Children with CZS included in this study were, in the first year of life, attended by a team of doctors, including geneticists, neuropsychiatrists, neurologists, ophthalmologists, physiotherapists, and (or) dentists. Subsequently, according to the needs related to the neurodevelopment of each child, they continued to be accompanied by some professionals, including pediatricians, physiotherapists, ophthalmologists, dentists, and (or) neurologists, among others, who are part of this study. Therefore, the clinical characteristics of these individuals, as well as ophthalmological and neuroimaging tests were obtained, when available, through the medical records of these consultations or through questionnaires applied to the mothers. Likewise, sociodemographic data were obtained through questionnaires applied during the medical consultation.

2.3. Genetic Analysis

A blood or saliva sample was collected from individuals and DNA extraction was performed by the FlexiGene DNA Kit (Qiagen, Hilden, Germany) or Oragene Kit (DNA Genotek, Ottawa, Ontario, Canada). Eleven polymorphisms in *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS3*, *TNF*, and *NOS2* genes were selected to be evaluated in this study. Information about the polymorphisms evaluated and the TaqMan assays used are found in Appendix A. The criteria for genetic variants selection were based on: (1) Minor Allele Frequency (MAF) > 1% (based on gnomAD database information for non-Finnish European and/or AbraOM database for Brazilian), and (2) functional description as modifiers of their gene's expression or protein function. The genotyping was performed through the TaqMan Genotyping Assay method in Step One Plus™ Real-Time PCR Systems (Thermo Fisher Scientific, Waltham, Massachusetts, EUA).

2.4. Statistical Analyses

A descriptive analysis of the congenital anomalies of individuals with CZS was performed. Quantitative variables were tested through the Shapiro–Wilk test to verify their normality and according to the distribution found, Student's *t* test or Mann–Whitney *U* test were applied. The Hardy–Weinberg equilibrium was tested for all polymorphisms. Categorical variables were compared between the groups by Chi-square test or Fisher's Exact Test. Through a univariate logistic regression analysis, we looked for associations between individual variables and the occurrence of CZS. *p*-values lower than 0.05 were considered to be significant. The SPSS v.18 software was used to perform the statistical analyses (IBM, Armonk, New York, NY, USA).

Linkage disequilibrium (LD) analysis was inferred with Haploview v.4.2. software (Broad Institute, Cambridge, MA, USA). The haplotypes were obtained with the Bayesian algorithm in Phase 2.1.1 software.

3. Results

3.1. Sociodemographic and Clinical Profile of Children Who Were In Utero Exposed to ZIKV Infection

Eighty-eight children who were in utero exposed to ZIKV infection were recruited for this study. Forty children developed Congenital Zika Syndrome (CZS) (case group) and forty-eight were born without alterations (control group). The sociodemographic characteristics of the children are presented in Table 1. There was a higher prevalence of black individuals in both case (77%) and control (65%) groups and, therefore, this variable did not present a statistically significant difference between the groups. As expected, weight, height, and the cephalic perimeter were higher in the control group ($p < 0.001$). Most mothers of children with CZS were exposed to ZIKV infection in the first trimester (80%) while most mothers of children without CZS were exposed to ZIKV infection the third trimester (44%) ($p < 0.001$). Cesarean section had a significantly higher prevalence in the control group (90%) ($p < 0.001$). Mothers of children with CZS had a lower educational ($p < 0.001$) and lower monthly family income ($p = 0.008$).

Table 1. Evaluation of Clinical, Gestational, and Sociodemographic Characteristics in the Case and Control Groups.

Variables	Case † (n = 40)	Control (n = 48)	p-Value ‡
Sex (n, %)			
Male	23 (57%)	26 (54%)	0.754
Female	17 (43%)	22 (46%)	
Ethnicity (n, %)			
Black	31 (77%)	31 (65%)	0.242
White	9 (23%)	17 (35%)	
Weight (kg)	2.5 (2.2–2.9)	3.2 (2.8–3.5)	<0.001 *
Height (cm)	45.0 (44.0–48.0)	49.0 (47.0–50.0)	0.001 *
Cephalic perimeter (cm)	29.0 (27.3–31.0)	35.0 (34.0–36.0)	<0.001 *
Gestational age at birth (weeks)	38.0 (37.0–39.0)	38.0 (37.0–38.7)	0.522
Types of delivery (n, %)			
Vaginal delivery	16/30 (53%)	5 (10%)	<0.001 *
Cesarean section	14/30 (47%)	43 (90%)	
Mother's age (years)	28.0 (22.5–35.5)	29.5 (22.0–33.0)	0.824
Father's age (years)	28.0 (24.0–37.8)	31.0 (26.0–35.0)	0.693
Trimester of ZIKV infection (n, %)			
1st	24/30 (80%)	13 (27%)	<0.001 *
2nd	4/30 (13%)	14 (29%)	
3rd	2/30 (7%)	21 (44%)	
Exposure during pregnancy (n, %)			
Alcohol	3/35 (9%)	14 (29%)	0.028 *
Smoke	0/35	1 (2%)	1.000
Drugs	0/35	1 (2%)	1.000
Maternal yellow fever vaccine (n, %)	18/24 (75%)	35 (73%)	1.000
Maternal educational level (n, %)			
Elementary school	13/38 (34%)	0	<0.001 *
High school	13/38 (34%)	2 (4%)	
Incomplete or complete higher education	12/38 (32%)	46 (96%)	
Monthly family income (n, %)			
Less than 3 minimum wages	23/27 (85%)	12/25 (46%)	0.008 *
Between 3 and 9 minimum wages	4/27 (15%)	12/25 (46%)	
More than 9 minimum wages	0	2/25 (8%)	

† In the case group, some information was not available or was not answered for all mothers. ‡ Quantitative variables were compared between the groups through the Student's *t* test or Mann–Whitney *U* test and categorical variables through the Chi-squared test or Fisher's exact test; Quantitative variables are presented as median and quartiles; * Statistically significant.

Congenital anomalies of the children with CZS are presented in Figure 1. Such anomalies were identified during the children's first year of life by a team of doctors and through dysmorphological, neuroimaging, and ophthalmic examinations that are available in some of the research and assistance centers in which the children have been treated.

For those whom the exams were performed and the information was available, the most prevalent clinical findings were microcephaly ($n = 40$ –100%), calcifications ($n = 22/24$ –92%), cerebral atrophy ($n = 11/12$ –92%), lissencephaly ($n = 10/12$ –83%), craniofacial disproportion ($n = 15/18$ –83%), ventriculomegaly ($n = 8/11$ –73%), and ocular alterations ($n = 22/32$ –69%).

Given the neurological impairment of most of these children, they continued to be accompanied by specific doctors, such as pediatricians and physiotherapists (more regularly), or ophthalmologists, dentists, and neurologists (more sporadically). Such monitoring varied again depending on the research and assistance center in which the children have been treated.

Table 2. Allelic and genotypic frequencies of polymorphisms in *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS3*, *TNF*, and *NOS2* genes in the case and control groups.

Gene	Polymorphism	Allele/Genotype	Case (n = 40)	Control (n = 48)	p-Value †
VEGFA (n, %)	rs1570360	G	70 (87%)	72 (75%)	0.054
		A	10 (13%)	24 (25%)	
		GG	30 (75%)	28 (58%)	0.109
		GA	10 (25%)	16 (33%)	
	rs2010963	AA	0	4 (9%)	
		G	39 (49%)	47 (49%)	1.000
		C	41 (51%)	49 (51%)	
		GG	11 (27%)	11 (23%)	0.821
	rs3025039	GC	18 (46%)	25 (52%)	
		CC	11 (27%)	12 (25%)	
		C	61 (76%)	84 (87%)	0.073
		T	19 (24%)	12 (13%)	
	CC	25 (63%)	36 (75%)	0.084	
	CT	11 (27%)	12 (25%)		
	TT	4 (10%)	0		
	PTGS2 (n, %)	rs689465	T	68 (85%)	77 (80%)
C			12 (15%)	19 (20%)	
TT			29 (73%)	30 (63%)	0.746
TC			10 (25%)	17 (35%)	
CC			1 (2%)	1 (2%)	
NOS3 (n, %)	rs2070744	T	57 (71%)	63 (66%)	0.516
		C	23 (29%)	33 (34%)	
		TT	20 (50%)	21 (44%)	0.679
		TC	17 (42%)	21 (44%)	
		CC	3 (8%)	6 (12%)	
	rs1799983	G	65 (81%)	73 (76%)	0.464
		T	15 (19%)	23 (24%)	
		GG	27 (67%)	25 (52%)	0.045 *
		TG	11 (28%)	23 (48%)	
		TT	2 (5%)	0	
TNF (n, %)	rs1799724	C	70 (87%)	86 (90%)	0.812
		T	10 (13%)	10 (10%)	
		CC	31 (78%)	40 (83%)	0.606
		CT	8 (20%)	6 (13%)	
		TT	1 (2%)	2 (4%)	
	rs361525	G	76 (95%)	93 (97%)	0.703
		A	4 (5%)	3 (3%)	
		GG	36 (90%)	45 (94%)	0.694
		GA	4 (10%)	3 (6%)	
	rs1799964	T	63 (79%)	75 (80%)	1.000
		C	17 (21%)	19 (20%)	
		TT	25 (62%)	31 (66%)	0.939
		TC	13 (33%)	13 (28%)	
NOS2 (n, %)	rs2779249	CC	2 (5%)	3 (6%)	
		C	28 (35%)	40 (42%)	0.437
		A	52 (65%)	56 (58%)	
		CC	6 (15%)	12 (25%)	0.521
	rs2297518	CA	16 (40%)	16 (33%)	
		AA	18 (45%)	20 (42%)	
		G	50 (62%)	76 (79%)	0.019 *
		A	30 (38%)	20 (21%)	
	GG	20 (50%)	33 (69%)	0.144	
	GA	10 (25%)	10 (21%)		
	AA	10 (25%)	5 (10%)		

† Chi-squared test or Fisher's exact test; * Statistically significant.

The genotypic frequencies of the rs1799983 (*NOS3*) were different between the groups ($p = 0.045$). Moreover, there was a higher frequency of the A allele of the rs2297518 (*NOS2*) in the case group ($p = 0.019$). The allelic and genotypic frequencies of the other polymorphisms showed no statistically significant difference between the groups.

The frequencies of haplotypes generated by combining alleles of variants in the same gene were also compared between groups (Table 3). The frequencies of the *VEGFA* haplotypes were statistically different between cases and controls ($p = 0.002$). Although, *NOS2* haplotypes also presented a differential frequency between the groups, these were not statistically significant ($p = 0.054$). The haplotypic frequencies of the other genes showed no statistically significant difference between the groups. In the *TNF* gene, the TCG haplotype (rs1799964, rs1799724, and rs361525, respectively) contained risk alleles associated with low *TNF* expression [15–18]. The frequency of this haplotype was compared between cases and controls, but there was no statistically significant difference.

Table 3. Frequencies of the haplotypes generated by the combination of alleles of the polymorphisms in *VEGFA*, *NOS3*, *TNF*, and *NOS2* genes in case and control groups.

Gene	Haplotypes †	Cases (n = 40)	Controls (n = 48)	p-Value §	
<i>VEGFA</i> (n, %)	GGC	30 (38%)	23 (24%)	0.002 *	
	GCC	25 (31%)	40 (42%)		
	GCT	14 (17%)	9 (9%)		
	AGC	4 (5%)	21 (22%)		
	AGT	4 (5%)	3 (3%)		
	ACC	2 (3%)	0		
	GGT	1 (1%)	0		
<i>NOS3</i> (n, %)	TG	55 (69%)	55 (57%)	0.156	
	CT	14 (17%)	15 (16%)		
	CG	9 (11%)	18 (19%)		
	TT	2 (3%)	8 (8%)		
<i>TNF</i> (n, %)	TCG	54 (66%)	68 (71%)	0.831	
	CCG	14 (16%)	16 (17%)		
	TTG	10 (13%)	9 (9%)		
	CCA	4 (5%)	3 (3%)		
	TCG ‡	53 (70%)	68 (73%)		0.732
	others ‡	23 (30%)	25 (27%)		
<i>NOS2</i> (n, %)	GA	37 (46%)	51 (53%)	0.054	
	AA	15 (19%)	7 (7%)		
	AC	15 (19%)	13 (14%)		
	GC	13 (16%)	25 (26%)		

† *VEGFA* haplotypes: variants rs1570360, rs2010963, and rs3025039, respectively; *NOS3*: rs2070744 and rs1799983, respectively; *TNF*: rs1799964, rs1799724, and rs361525, respectively; *NOS2*: rs2297518, and rs2779249, respectively;

‡ Comparison of the frequencies of a haplotype containing all alleles associated with low expression of the *TNF* against the other haplotypes; § Chi-squared test or Fisher's exact test; * Statistically significant.

Table 4 presents the results of a univariate logistic regression analysis of significant risk variables for the CZS. The first trimester of exposure to the ZIKV infection was related to a higher risk to CZS development (OR: 19.38, CI 95% 4.70–133.78, $p < 0.001$). Furthermore, the presence of the A allele of the rs2297518 (*NOS2*) was related to a higher risk to the CZS (OR: 2.28, CI 95% 1.17–4.50, $p = 0.015$).

Table 4. Univariate logistic regression showing risk variables for the Congenital Zika Syndrome.

Risk Variables	Odds Ratio (95% IC)	p-Value
1st trimester of ZIKV infection	19.38 (95% IC 4.70–133.78)	<0.001 *
<i>NOS2</i> rs2297518[A]	2.28 (95% IC 1.17–4.50)	0.015 *

[A]: allele A of the *NOS2* rs2297518 genetic variant; * Statistically significant.

A specific phenotype of the CZS, the severity of the microcephaly, was evaluated in the case group. Mild or moderate microcephaly was defined if the head circumference

was between 2 and 3 standard deviation (SD) below the mean for sex and age, and severe if it was 3 or more SD below the mean [19]. Children with 2SD of microcephaly were compared to children with 3SD of microcephaly for the frequency of two variables already reported in the literature as related to these phenotypes—trimester of ZIKV infection and *TNF* gene [20,21]. The results of such analysis are presented in Table 5. The frequency of ZIKV infection in the first trimester was higher in children with severe microcephaly (100%), compared with children with moderate microcephaly (33%) ($p = 0.019$). Children with severe microcephaly presented higher frequency of the T allele and genotypes TT or CT of the *TNF* rs1799724, compared with children with moderate microcephaly ($p = 0.029$ and $p = 0.041$, respectively). Moreover, the two groups presented a differential frequency of *TNF* haplotypes ($p = 0.030$), with an especially higher frequency of the TCG haplotype, which contains all the alleles related to the lower expression of *TNF* [15–18]. This haplotype is found in 88% of the children with moderate microcephaly (<2SD) against 58% in children with severe microcephaly (<3SD) ($p = 0.079$).

Table 5. Association between trimester of Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy or *TNF* polymorphisms and the severity of microcephaly in cases with CZS.

Variables	Allele/ Genotype/ Haplotype	Severity of Microcephaly		<i>p</i> -Value
		Mild (<i>n</i> = 8)	Severe (<i>n</i> = 12)	
Trimester of ZIKV infection † (n, %)				
	1st	2 (33%)	7 (100%)	0.019
	2nd	3 (50%)	0	
	3rd	1 (17%)	0	
TNF (n, %)				
rs1799724	T	0	7 (29%)	0.029 *
	C	16 (100%)	17 (71%)	
	CC	8 (100%)	6 (50%)	0.041 *
	CT	0	5 (42%)	
	TT	0	1 (8%)	
rs361525	A	1 (6%)	0	0.400
	G	15 (94%)	24 (100%)	
	GG	7 (87%)	12 (100%)	
	AG	1 (13%)	0	
rs1799964	C	2 (13%)	3 (13%)	1.000
	T	14 (87%)	21 (87%)	
	TT	6 (75%)	9 (75%)	
	CT	2 (25%)	3 (25%)	
Haplotypes ‡	CCG	1 (6%)	3 (13%)	0.030 *
	CCA	1 (6%)	0	
	TCG	14 (88%)	14 (58%)	
	TTG	0	7 (29%)	
	TCG §	14	14	
	others §	2	10	

† The information about the trimester of exposure to ZIKV infection during pregnancy was not available for all children with data of the severity of the microcephaly; ‡ *TNF* haplotypes: variants rs1799964, rs1799724, and rs361525, respectively; § Comparison of the frequencies of a haplotype containing all the alleles associated with low expression of the *TNF* against the other haplotypes; Chi-squared test or Fisher's exact test; * Statistically significant.

4. Discussion

Zika virus teratogenic potential has been discovered in the recent years; thus, little is known about the susceptibility factors and mechanisms related to the adverse effects caused by its exposure in embryos and fetuses in development so far. It is known that around 1 to

42% of embryos or fetuses with in utero exposure to ZIKV infection developed the CZS [4]. Discordant twins for CZS have been shown to be not uncommon [9]. Based on this, it is important to take into account the environmental and genetic factors that may confer susceptibility to ZIKV teratogenesis. In this work, we evaluated some sociodemographic, clinical, and genetic variants as possible risk factors to CZS in a sample of children who were in utero exposed to ZIKV infection, comparing children who were born with and without CZS.

Regarding some gestational risk factor to CZS, the exposure to ZIKV in the first trimester of pregnancy has been reported as a risk factor to CZS, presenting more severe congenital anomalies than later exposures [2,6]. Our results corroborate these findings, since we found a higher prevalence of children with CZS who were exposed in utero to ZIKV in the first trimester of pregnancy while children born without congenital anomalies were predominantly exposed in second and third trimester of gestation. Moreover, we found a higher frequency of the first trimester exposure in children with severe microcephaly.

Still, in this context of environmental variables possibly involved with the teratogenic effects of ZIKV, the socioeconomic level has been discussed as a possible environmental factor associated with this asymmetric distribution of CZS in Brazil [22]. That discussion is important, since this variable was also associated with the availability and quality of mothers' diets during pregnancy, a condition recently also associated with the development of CZS [23]. In the present sample, we observed that families of children with CZS had a lower socioeconomic level compared to families of children without CZS. Mothers in the case group had a lower educational level and reported lower family income. This finding is not new in the literature, since low socioeconomic level has been described as a risk factor for congenital anomalies. Therefore, it is probably that this population presents a higher risk for negative outcomes after ZIKV infection during pregnancy [24,25].

In relation to genetic risk factors, through the analyses of functional genetic variants in *VEGFA*, *PTGS2*, *NOS3*, *TNF*, and *NOS2*, genes related to immune and inflammatory response, we found different allelic, genotypic, and haplotypic frequencies between children with and without CZS. Regarding the *NOS2* gene, we found a higher prevalence of the rs2297518 allele A in children with CZS, being that this allele is associated with an increased risk to CZS (OR: 2.28 (95% IC 1.17–4.50)). *NOS2* rs2297518 is a functional polymorphism that affects the iNOS protein activity, with the A allele related to increased protein activity and higher nitric oxide (NO) production [26,27]. NO has been reported as playing major roles in neurogenesis and neurodevelopment, and its dosage is extremely important [28,29]. The dysregulation of NO has been involved in the progression of many neurodevelopmental, neurobehavioral, and neurodegenerative disorders [29]. In this sense, the dysregulation of NO during ZIKV infection, caused both by the host response to the virus and by the individual's genotype, could affect the development process causing a congenital anomaly.

Similarly, the haplotypic frequencies of two genes, *VEGFA* and *NOS2*, were different between children with and without CZS. The comparison of haplotype frequencies between cases and controls has been suggested as helping to identify overlapping haplotypes among affected individuals, representing a shared region that contains a genetic risk factor [30]. We highlight that the *NOS2* gene haplotypic frequency was different between the two groups of children who were in utero exposed to ZIKV infection; however, it has not reached statistical significance, probably due to the sample size of the groups. On the other hand, *VEGFA* presented a statistically significant difference of its haplotype frequencies between the two groups. *VEGFA* is an important gene during neurodevelopment, acting on the neurogenesis, neuronal differentiation, and angiogenesis processes [31,32]. Genetic variants and haplotypes that affect the expression of this gene have the potential to impact and impair these developmental processes [31]. In the context of ZIKV infection during the developing brain, where the expression of this gene seems to be already affected, the presence of genetic variants and haplotypes that decreased its expression could modulate the impact of ZIKV for a worse scenario, further damaging neurogenesis and processing angiogenesis.

Focusing on a specific phenotype of the CZS, the severity of the microcephaly, we found an association of it and the *TNF* gene. The frequency of the rs1799724[T] was higher in children with a severe microcephaly. This allele has been related to the higher expression of the *TNF* gene [15,16]. The haplotypes of *TNF* also showed a different frequency between children with CZS and moderate or severe microcephaly, but in this scenario, a higher frequency of the TCG haplotype was found in children with a moderate microcephaly. This haplotype is composed by the three alleles of the variants rs1799964[T], rs1799724[C], and rs361525[G] of *TNF* related to the low expression of the gene [15–18]. *TNF* is a cytokine that, among many functions, has pro-inflammatory effects during a viral infection [33]. The immunological and inflammatory effects caused by *TNF* act in the eradication of infectious agents, but they can cause tissue damage, cell death, and systemic effects [33]. In this sense, the higher frequency of the rs1799724[T] in children with severe microcephaly, leading to a greater expression of *TNF*, combined with the natural increase of *TNF* expression to combat the ZIKV infection could be associated to this most severe phenotype in these individuals due to an exacerbated immunological and inflammatory response in the neural cells. On the other hand, the higher frequency of the TCG haplotype of *TNF* in individuals with moderate microcephaly, which is associated with the lower expression of *TNF*, could also explain this less severe phenotype in these individuals.

It is important to highlight that the polymorphisms evaluated in this study affect the expression of their genes or function of the proteins, which act on the fetus' brain, both in the context of development and inflammatory response [34–39]. Since the aim of this study was evaluating the role that these polymorphisms could have, in the context of the ZIKV infection, on the fetal brain development, we considered that it would be interesting to evaluate their frequency only in individuals with CZS and individuals who have been exposed in utero to the ZIKV infection but were born normal and, in this sense, the parents were not evaluated, since this analysis would not add information to answer to the aim of the study.

In addition, although these genes and polymorphisms have an important role in neurogenesis or neuroinflammation, they have not been described as capable of causing the phenotypes seen in CZS, such as microcephaly, among others outside the context of the ZIKV infection [34–41]. This could mean that ZIKV infection potentiates the effect of these polymorphisms and, for this reason, they act on individuals' susceptibility to CZS in the context of ZIKV infection.

Despite the interesting results of the present study, some limitations of should be considered for the results to be interpreted in a clear and unbiased manner. Firstly, the sample size of our sample is a limiting factor in the study, as it restricts our power to make strong associations and prevents us from performing more robust statistical analyses. Moreover, it is important to highlight that the number of children with CZS coming from a given region was not matched with the number of children without CZS coming from the same region. These two aspects of the sample may have been responsible for the fact that some genotypic frequencies found in this work were not consistent with the Hardy–Weinberg equilibrium. In this sense, the associations observed in the present study need to be confirmed by other studies in order better understand their real impact on CZS. Although the sample was obtained in partnership with several Brazilian institutions, the recruitment of new and well documented cases is difficult, taking into account that the ZIKV outbreak in Brazil has decreased considerably since 2017. In addition, there are a great number of cases where the confirmation of infection has been lost and, therefore, they were not included in this study. Regarding the clinical description of the individuals in the case group, the data were not available to all individuals due to the resources of the institution where they were attended and their possibility of carrying out exams.

The investigation for risk factors for the ZIKV teratogenesis and for the understanding of its molecular mechanisms still has much to advance, since little is known about this. Teratogenesis is a complex event and, therefore, there is not only one factor that can explain the susceptibility to damage caused by a teratogen exposure. In this study, we reported

an interesting association of alleles and haplotypes of *NOS2*, *VEGFA*, and *TNF* genes with the CZS development and severity of the microcephaly in the CZS. Moreover, our results corroborate that the exposure to ZIKV in the first trimester of pregnancy is associated with the CZS as well as with the severity of the microcephaly in the affected individuals. Similarly, we found the socioeconomic level as a possible environmental risk factor to CZS. Future studies must explore such variables in larger samples as well as explore other possible risk factors to the ZIKV teratogenesis.

Author Contributions: Conceptualization of the study, J.A.G., L.S.-F. and F.S.L.V.; acquisition, analysis, and interpretation of the data, J.A.G., J.A.B., E.S., A.C.P.T.-T., J.H.d.S., B.F.R.R., M.F.G., T.M.d.O., M.D.F.C.d.A. and I.F.C.; writing—original draft preparation, J.A.G.; writing—review and editing, J.A.G., J.A.B., F.S.L.V.; supervision, L.S.-F. and F.S.L.V.; project administration, J.A.G. and F.S.L.V.; funding acquisition J.A.G., L.S.-F. and F.S.L.V. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: This research was funded by Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (IN-AGEMP), grant numbers CNPq 573993/2008-4 and FAPERGS 17/2551.0000521-0; Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)-Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), grant numbers 2017-0619 and 2019-0295; and Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) grant number Chamada MCTIC/FNDCT-CNPq/MEC-CAPES/MS-Decit/N° 14/2016—Prevenção e Combate ao vírus Zika. The APC was funded by Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)-Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE), grant numbers 2017-0619, 2019-0295. FSLV is recipient of a CNPq scholarship grant [grant number CNPq 312993/2017-0].

Institutional Review Board Statement: The study was conducted according to the guidelines of the Declaration of Helsinki, and approved by the Ethics Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (protocol code 170619—CAAE 78735817910015327, approved in 22 October 2017).

Informed Consent Statement: Informed consent was obtained from all legal guardians of the subjects involved in the study.

Data Availability Statement: The data presented in this study are available on request from the corresponding author. The data are not publicly available due to privacy.

Acknowledgments: We appreciate all parents and children for their participation in this study.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

Appendix A

Table A1. General information of the polymorphisms evaluated.

Gene	Polymorphism	Commercial Assay Codes †	Allelic Frequency ‡	Allelic Frequency §	Gene Location	Impact on the Gene or Protein
<i>VEGFA</i>	rs1570360	C_1647379_10	A = 34%	A = 24%	promoter	<i>VEGFA</i> gene expression
	rs2010963	C_8311614_10	C = 29%	C = 36%	5'UTR	<i>VEGFA</i> gene expression
	rs3025039	C_16198794_10	T = 15%	T = 13%	3'UTR	<i>VEGFA</i> mRNA concentration
<i>PTGS2</i>	rs689465	C_2517146_10	C = 12%	-	promoter	In combination with other genetic variants in haplotypes, it affects <i>PTGS2</i> expression
<i>NOS3</i>	rs2070744	C_15903863_10	C = 37%	-	intron	<i>NOS3</i> gene expression
	rs1799983	C_3219460_20	T = 32%	T = 29%	missense	eNOS enzyme activity
<i>TNF</i>	rs1799724	C_11918223_10	T = 9%	-	promoter	<i>TNF</i> gene expression
	rs361525	C_2215707_10	A = 4%	A = 5%	promoter	<i>TNF</i> gene expression
	rs1799964	C_7514871_10	C = 20%	C = 24%	promoter	<i>TNF</i> gene expression
<i>NOS2</i>	rs2779249	C_2593689_10	A = 29%	-	intron	iNOS protein activity
	rs2297518	C_11889257_10	A = 19%	A = 17%	missense	iNOS protein activity

† TaqMan assays used to genotype the polymorphisms in this study; ‡ Data from gnomAD database (European non-Finnish population); § Data from AbraOM database (Brazilian population).

References

- Schuler-Faccini, L.; Sanseverino, M.T.V.; Vianna, F.S.L.; Da Silva, A.A.; Larrandaburu, M.; Marcolongo-Pereira, C.; Abeche, A.M. Zika virus: A new human teratogen? Implications for women of reproductive age. *Clin. Pharmacol. Ther.* **2016**, *100*, 28–30. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- França, G.V.A.; Schuler-Faccini, L.; Oliveira, W.K.; Henriques, C.M.P.; Carmo, E.H.; Pedi, V.D.; Nunes, M.L.; Castro, M.C.; Serruya, S.; Silveira, M.F.; et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: A case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* **2016**, *388*, 891–897. [[CrossRef](#)]
- Jaenisch, T.; Rosenberger, K.D.; Brito, C.; Brady, O.; Brasil, P.; Marques, E.T.A. Risk of microcephaly after Zika virus infection in Brazil, 2015 to 2016. *Bull. World Health Organ.* **2017**, *95*, 191–198. [[CrossRef](#)]
- Nithiyantham, S.F.; Badawi, A. Maternal infection with Zika virus and prevalence of congenital disorders in infants: Systematic review and meta-analysis. *Can. J. Public Health* **2019**, *110*, 638–648. [[CrossRef](#)]
- Werner, H.; Fazecas, T.; Guedes, B.; Lopes Dos Santos, J.; Daltro, P.; Tonni, G.; Campbell, S.; Araujo Júnior, E. Intrauterine Zika virus infection and microcephaly: Correlation of perinatal imaging and three-dimensional virtual physical models. *Ultrasound Obstet. Gynecol.* **2016**, *47*, 657–660. [[CrossRef](#)]
- Werner, H.; Sodré, D.; Hygino, C.; Guedes, B.; Fazecas, T.; Nogueira, R.; Daltro, P.; Tonni, G.; Lopes, J.; Araujo Júnior, E. First-trimester intrauterine Zika virus infection and brain pathology: Prenatal and postnatal neuroimaging findings. *Prenat. Diagn.* **2016**, *36*, 785–789. [[CrossRef](#)]
- Zhang, F.; Hammack, C.; Ogden, S.C.; Cheng, Y.; Lee, E.M.; Wen, Z.; Qian, X.; Nguyen, H.N.; Li, Y.; Yao, B.; et al. Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. *Nucleic Acids Res.* **2016**, *44*, 8610–8620. [[CrossRef](#)]
- Garcez, P.P.; Nascimento, J.M.; De Vasconcelos, J.M.; Madeiro Da Costa, R.; Delvecchio, R.; Trindade, P.; Loiola, E.C.; Higa, L.M.; Cassoli, J.S.; Vitória, G.; et al. Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci. Rep.* **2017**, *7*. [[CrossRef](#)]
- Caires-Júnior, L.C.; Goulart, E.; Melo, U.S.; Araujo, B.S.H.; Alvizi, L.; Soares-Schanoski, A.; De Oliveira, D.F.; Kobayashi, G.S.; Griesi-Oliveira, K.; Musso, C.M.; et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat. Commun.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
- Lima, M.C.; de Mendonça, L.R.; Rezende, A.M.; Carrera, R.M.; Anibal-Silva, C.E.; Demers, M.; D’Aiuto, L.; Wood, J.; Chowdari, K.V.; Griffiths, M.; et al. The transcriptional and protein profile from human infected neuroprogenitor cells is strongly correlated to zika virus microcephaly cytokines phenotype evidencing a persistent inflammation in the CNS. *Front. Immunol.* **2019**, *10*. [[CrossRef](#)]
- Bayless, N.L.; Greenberg, R.S.; Swigut, T.; Wysocka, J.; Blish, C.A. Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* **2016**, *20*, 423–428. [[CrossRef](#)]
- de Sousa, J.R.; Azevedo, R. do S. da S.; Martins Filho, A.J.; de Araujo, M.T.F.; Cruz, E. do R.M.; Vasconcelos, B.C.B.; Cruz, A.C.R.; de Oliveira, C.S.; Martins, L.C.; Vasconcelos, B.H.B.; et al. In situ inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases. *Cytokine* **2018**, *111*, 255–264. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Diop, F.; Vial, T.; Ferraris, P.; Wichit, S.; Bengue, M.; Hamel, R.; Talignani, L.; Liegeois, F.; Pompon, J.; Yssel, H.; et al. Zika virus infection modulates the metabolomic profile of microglial cells. *PLoS ONE* **2018**, *13*, e0206093. [[CrossRef](#)]
- Tiwari, S.K.; Dang, J.; Qin, Y.; Lichinchi, G.; Bansal, V.; Rana, T.M. Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. *Emerg. Microbes Infect.* **2017**, *6*. [[CrossRef](#)]
- Shi, K.Q.; Cai, X.H.; Xiao, D.D.; Wu, S.J.; Peng, M.M.; Lin, X.F.; Liu, W.Y.; Fan, Y.C.; Chen, Y.P.; Zheng, M.H. Tumor necrosis factor- α -857T allele reduces the risk of hepatitis B virus infection in an Asian population. *J. Viral Hepat.* **2012**, *19*. [[CrossRef](#)]
- Wang, P.; Wang, J.; Yu, M.; Li, Z. Tumor necrosis factor- α T-857C (rs1799724) polymorphism and risk of cancers: A meta-analysis. *Dis. Markers* **2016**, *2016*, 4580323. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Nourian, M.; Chaleshi, V.; Pishkar, L.; Azimzadeh, P.; Baradaran Ghavami, S.; Balaii, H.; Alinaghi, S.; Shahrokh, S.; Asadzadeh Aghdaei, H.; Zali, M.R. Evaluation of tumor necrosis factor (TNF)- α mRNA expression level and the rs1799964 polymorphism of the TNF- α gene in peripheral mononuclear cells of patients with inflammatory bowel diseases. *Biomed. Rep.* **2017**, *6*, 698–702. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
- Xu, T.; Kong, Z.; Zhao, H. Relationship between tumor necrosis factor- α rs361525 polymorphism and gastric cancer risk: A meta-analysis. *Front. Physiol.* **2018**, *9*. [[CrossRef](#)]
- Carvalho, F.H.C.; Cordeiro, K.M.; Peixoto, A.B.; Tonni, G.; Moron, A.F.; Feitosa, F.E.L.; Feitosa, H.N.; Araujo Júnior, E. Associated ultrasonographic findings in fetuses with microcephaly because of suspected Zika virus (ZIKV) infection during pregnancy. *Prenat. Diagn.* **2016**, *36*, 882–887. [[CrossRef](#)]
- Santos, C.N.O.; Ribeiro, D.R.; Cardoso Alves, J.; Cazzaniga, R.A.; Magalhães, L.S.; De Souza, M.S.F.; Fonseca, A.B.L.; Bispo, A.J.B.; Porto, R.L.S.; Dos Santos, C.A.; et al. Association between Zika Virus Microcephaly in Newborns with the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *J. Infect. Dis.* **2019**, *220*, 1797–1801. [[CrossRef](#)]
- Antoniou, E.; Orovou, E.; Sarella, A.; Iliadou, M.; Rigas, N.; Palaska, E.; Iatrakis, G.; Dagla, M. Zika virus and the risk of developing microcephaly in infants: A systematic review. *Int. J. Environ. Res. Public Health* **2020**, *17*, 3806. [[CrossRef](#)]
- Barbeito-Andrés, J.; Schuler-Faccini, L.; Garcez, P.P. Why is congenital Zika syndrome asymmetrically distributed among human populations? *PLoS Biol.* **2018**, *16*. [[CrossRef](#)]
- Barbeito-Andrés, J.; Pezzuto, P.; Higa, L.M.; Dias, A.A.; Vasconcelos, J.M.; Santos, T.M.P.; Ferreira, J.C.C.G.; Ferreira, R.O.; Dutra, F.F.; Rossi, A.D.; et al. Congenital Zika syndrome is associated with maternal protein malnutrition. *Sci. Adv.* **2020**, *6*. [[CrossRef](#)]

24. Yang, J.; Carmichael, S.L.; Canfield, M.; Song, J.; Shaw, G.M. Socioeconomic status in relation to selected birth defects in a large multicentered US case-control study. *Am. J. Epidemiol.* **2008**, *167*, 145–154. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
25. Carmichael, S.L.; Nelson, V.; Shaw, G.M.; Wasserman, C.R.; Croen, L.A. Socio-economic status and risk of conotruncal heart defects and orofacial clefts. *Paediatr. Perinat. Epidemiol.* **2003**, *17*, 264–271. [[CrossRef](#)]
26. Dhillon, S.S.; Mastropaolo, L.A.; Murchie, R.; Griffiths, C.; Thöni, C.; Elkadri, A.; Xu, W.; Mack, A.; Walters, T.; Guo, C.; et al. Higher activity of the inducible nitric oxide synthase contributes to very early onset inflammatory bowel disease. *Clin. Transl. Gastroenterol.* **2014**, *5*. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
27. Nikkari, S.T.; Määttä, K.M.; Kunnas, T.A. Functional inducible nitric oxide synthase gene variants associate with hypertension a case-control study in a finnish population—the TAMRISK study. *Medicine (United States)* **2015**, *94*, e1958. [[CrossRef](#)]
28. Garry, P.S.; Ezra, M.; Rowland, M.J.; Westbrook, J.; Pattinson, K.T.S. The role of the nitric oxide pathway in brain injury and its treatment—From bench to bedside. *Exp. Neurol.* **2015**, *263*, 235–243. [[CrossRef](#)]
29. Tripathi, M.K.; Kartawy, M.; Amal, H. The role of nitric oxide in brain disorders: Autism spectrum disorder and other psychiatric, neurological, and neurodegenerative disorders. *Redox Biol.* **2020**, *34*, 101567. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Silverman, E.K. Haplotype thinking in lung disease. *Proc. Am. Thorac. Soc.* **2007**, *4*, 4–8. [[CrossRef](#)]
31. Raab, S.; Beck, H.; Gaumann, A.; Yüce, A.; Gerber, H.P.; Plate, K.; Hammes, H.P.; Ferrara, N.; Breier, G. Impaired brain angiogenesis and neuronal apoptosis induced by conditional homozygous inactivation of vascular endothelial growth factor. *Thromb. Haemost.* **2004**, *91*, 595–605. [[CrossRef](#)]
32. Rosenstein, J.M.; Krum, J.M.; Ruhrberg, C. VEGF in the nervous system. *Organogenesis* **2010**, *6*, 107–114. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Waters, J.P.; Pober, J.S.; Bradley, J.R. Tumour necrosis factor in infectious disease. *J. Pathol.* **2013**, *230*, 132–147. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Jin, K.; Zhu, Y.; Sun, Y.; Mao, X.O.; Xie, L.; Greenberg, D.A. Vascular endothelial growth factor (VEGF) stimulates neurogenesis in vitro and in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2002**, *99*, 11946–11950. [[CrossRef](#)]
35. Bogdan, C. Nitric oxide synthase in innate and adaptive immunity: An update. *Trends Immunol.* **2015**, *36*, 161–178. [[CrossRef](#)]
36. Ricciotti, E.; Fitzgerald, G.A. Prostaglandins and inflammation. *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* **2011**, *31*, 986–1000. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
37. Chavez, G.G.; Taylor, G.; Garaliene, J.; Richardson, G.P.; Korneev, S.A. The temporal expression profile of a Nos3-related natural antisense RNA in the brain suggests a possible role in neurogenesis. *Nitric Oxide Biol. Chem.* **2017**, *71*, 27–31. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
38. Muhammad, M. Tumor Necrosis Factor Alpha: A Major Cytokine of Brain Neuroinflammation. In *Cytokines*; IntechOpen: London, UK, 2020. [[CrossRef](#)]
39. Olivera, G.C.; Ren, X.; Vodnala, S.K.; Lu, J.; Coppo, L.; Leepiyasakulchai, C.; Holmgren, A.; Kristensson, K.; Rottenberg, M.E. Nitric Oxide Protects against Infection-Induced Neuroinflammation by Preserving the Stability of the Blood-Brain Barrier. *PLoS Pathog.* **2016**, *12*, e1005442. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
40. Wang, J.; Liu, J.; Zhou, R.; Ding, X.; Zhang, Q.; Zhang, C.; Li, L. Zika virus infected primary microglia impairs NPCs proliferation and differentiation. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2018**, *497*, 619–625. [[CrossRef](#)]
41. Ensembl Genome Browser 102. Available online: <https://www.ensembl.org/index.html> (accessed on 4 February 2021).

CAPÍTULO VIII

Artigo 5

Functional Polymorphisms in the p53 Pathway Genes on the Genetic
Susceptibility to Zika Virus Teratogenesis

Publicado na Frontiers in Cellular & Infection Microbiology



Functional Polymorphisms in the p53 Pathway Genes on the Genetic Susceptibility to Zika Virus Teratogenesis

Julia A. Gomes^{1,2,3,4*}, Eduarda Sgarioni¹, Igor A. Vieira^{1,4}, Lucas R. Fraga^{2,3,4,5}, Patrícia Ashton-Prolla^{1,4}, Ana Cláudia P. Terças-Tretell⁶, Juliana H. da Silva⁷, Bethânia FR Ribeiro⁸, Marcial F. Galera⁹, Thalita M. de Oliveira¹⁰, Maria Denise F. Carvalho de Andrade¹¹, Isabella F. Carvalho¹², Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,3} and Fernanda S. L. Vianna^{1,2,3,4*}

OPEN ACCESS

Edited by:

Daniel Adesse,
Oswaldo Cruz Foundation (Fiocruz),
Brazil

Reviewed by:

Shashi K Tiwari,
University of California, San Diego,
United States
Lucia Elena Alvarado-Amez,
Franz Tamayo University, Bolivia

*Correspondence:

Julia A. Gomes
juuliadoamaral@gmail.com
Fernanda S. L. Vianna
fslvianna@gmail.com

Specialty section:

This article was submitted to
Parasite and Host,
a section of the journal
Frontiers in Cellular and
Infection Microbiology

Received: 14 December 2020

Accepted: 14 June 2021

Published: 07 July 2021

Citation:

Gomes JA, Sgarioni E, Vieira IA, Fraga LR, Ashton-Prolla P, Terças-Tretell ACP, da Silva JH, Ribeiro BFR, Galera MF, de Oliveira TM, Carvalho de Andrade MDF, Carvalho IF, Schuler-Faccini L and Vianna FSL (2021) Functional Polymorphisms in the p53 Pathway Genes on the Genetic Susceptibility to Zika Virus Teratogenesis. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 11:641413. doi: 10.3389/fcimb.2021.641413

¹ Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular (PPGBM), Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil, ² Sistema Nacional de Informação sobre Agentes Teratogênicos (SIAT), Serviço de Genética Médica, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil, ³ Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil, ⁴ Laboratório de Medicina Genômica (LMG), Centro de Pesquisa Experimental (CPE), Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil, ⁵ Departamento de Ciências Morfológicas, Instituto de Ciências Básicas da Saúde, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Brazil, ⁶ Departamento de Enfermagem, Universidade do Estado de Mato Grosso (UNEMAT), Tangará da Serra, Brazil, ⁷ Secretaria Municipal de Saúde de Tangará da Serra, Tangará da Serra, Brazil, ⁸ Fundação Hospital das Clínicas do Acre (FUNDACRE), Rio Branco, Brazil, ⁹ Departamento de Pediatria, Faculdade de Medicina, Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brazil, ¹⁰ Hospital Universitário Júlio Müller (HUJM), Universidade Federal de Mato Grosso (UFMT), Cuiabá, Brazil, ¹¹ Curso de Medicina, Universidade Estadual do Ceará (UECE), Fortaleza, Brazil, ¹² Curso de Odontologia, Centro Universitário Christus (UNICHRISTUS), Fortaleza, Brazil

Congenital Zika Syndrome (CZS) occurs in up to 42% of individuals exposed to ZIKV prenatally. Deregulation in gene expression and protein levels of components of the p53 signaling pathway, such as p53 and MDM2, due to ZIKV infection has been reported. Here, we evaluate functional polymorphisms in genes of the p53 signaling pathway as risk factors to CZS. Forty children born with CZS and forty-eight children exposed to ZIKV, but born without congenital anomalies were included in this study. Gestational and sociodemographic information as well as the genotypic and allelic frequencies of functional polymorphisms in *TP53*, *MDM2*, *MIR605* and *LIF* genes were compared between the two groups. We found children with CZS exposed predominantly in the first trimester and controls in the third trimester ($p < 0.001$). Moreover, children with CZS were predominantly from families with a lower socioeconomic level ($p = 0.008$). We did not find a statistically significant association between the investigated polymorphisms and development of CZS; however, by comparing individuals with CZS and lissencephaly or without lissencephaly, we found a significant difference in the allelic frequencies of the *TP53* rs1042522, which is associated with a more potent p53-induced apoptosis ($p = 0.007$). Our findings suggest that the *TP53* rs1042522 polymorphism should be

better investigate as a genetic risk factor for the development of lissencephaly in children with CZS.

Keywords: congenital abnormalities, Zika virus infection, teratogens, genetic polymorphism, disease susceptibility, risk factors, apoptosis, lissencephaly

INTRODUCTION

Zika virus (ZIKV) is a human teratogen that infects neural cells of children exposed during pregnancy and causes a spectrum of multiple congenital anomalies named Congenital Zika Syndrome (CZS), which includes microcephaly, brain calcifications, lissencephaly, ventriculomegaly, ocular alterations, among others (del Campo et al., 2017). It has been reported that up to 42% of all individuals exposed to ZIKV during pregnancy indeed develop the CZS (Nithiyantham and Badawi, 2019).

Recently, *in silico* and *in vitro* studies have shown that the p53 protein, encoded by the *TP53* gene, is differentially expressed in human neuroprogenitor cells (hNPCs) during ZIKV infection (El Ghouzzi et al., 2016; Zhang et al., 2016). Importantly, the increase in the *TP53* expression under this condition induce cell cycle arrest and death of developing neurons, and it has been proposed as a possible mechanism for ZIKV teratogenesis (El Ghouzzi et al., 2016; Bhagat et al., 2018). Through a systems biology approach, it was identified that p53 is the central protein of a genetic regulatory network of proteins associated with the ZIKV infection and those associated with microcephaly occurrence (Teng et al., 2017). In addition, it was demonstrated that increased p53 activity leads to an increased death rate of neural cells due to the binding of the ZIKV capsid protein to MDM2 protein, decreasing its activity as one of the main p53 negative regulators (Teng et al., 2017).

In a context of wild-type *TP53* sequence, constitutive p53 protein levels and activity can be modulated directly or indirectly by several regulator proteins and specific microRNAs (miRNAs) (Liu and Chen, 2006; Hermeking, 2012). LIF, a cytokine encoded by the *LIF* gene, is a p53 regulator that can both indirectly repress p53 functions in human cells through the induction of MDM2, or it can be up-regulated by p53 itself (Liu et al., 2015). Like p53, LIF protein appears to be increased in brain cells infected by ZIKV (Bayless et al., 2016). Recently, the role of miRNAs has been described in ZIKV infection, and dysregulation of nervous system development pathways mediated by several miRNAs was demonstrated (Bhagat et al., 2018). The miR-605 is an miRNA that acts as an indirect modulator of *TP53* gene expression through the negative regulation that it exerts targeting *MDM2* transcripts (Xiao et al., 2011).

Based on previous evidence of differential susceptibility to ZIKV teratogenesis in humans, as well as possible involvement of the p53 signaling pathway in this outcome, we investigated the role of functional single nucleotide variants (SNVs) in genes of the p53 signaling pathway as potential susceptibility factors to CZS in a sample of Brazilian children exposed to ZIKV during pregnancy. In addition, we evaluated the impact of ZIKV infection on the expression of genes of this pathway in neuroprogenitor cells, the main targets of ZIKV in the developing brain.

MATERIALS AND METHODS

Ethical Issues

This study was carried out following the rules of the Declaration of Helsinki and approved by the Ethics and Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre, institution responsible for this study (n° 170619 – CAAE 78735817910015327), and by all participating institutions. All legal guardians of individuals recruited for this study gave their informed consent for inclusion before they participated in the study.

Sample

This case-control study was conducted with 88 children exposed to the ZIKV infection during pregnancy. Forty children were born with CZS and 48 were born without congenital anomalies. Recruitment for the study required evidence of ZIKV exposure, defined as a positive result in the RT-PCR test to detect viral RNA or typical symptoms of infection (e.g. rash, fever and joint pain) during any time of the pregnancy. Patients in the CZS group (n=40) were recruited from reports of microcephaly in five Brazilian research and/or assistance centers: North region (Fundação Hospital das Clínicas do Acre, n=4), Northeast (Universidade Estadual do Ceará, n=21), Midwest (Universidade do Estado de Mato Grosso, n=2 and Hospital Universitário Júlio Müller, n=12) and South (Hospital de Clínicas de Porto Alegre, n=1). Control group was recruited in the same centers from the North region (n=1), Midwest (n=46, from a cohort of women that gave birth in 2016, in the city of Tangará da Serra) and South (n=1) of the country.

Sociodemographic and pregnancy characteristics were obtained from questionnaires answered by mothers during medical consultation. Clinical data (dysmorphological features and, when available, the results of the neuroimaging and ophthalmological exams) were obtained from chart review and direct consultation and interviews done by physicians.

Genetic Analysis

Blood or saliva samples were collected from participants and the DNA extraction was performed using FlexiGene DNA (Qiagen®) or Oragene (DNA Genotek) kits. Functional single nucleotide variants (SNVs) in *TP53*, *MDM2*, *MIR605* and *LIF* were selected based on their previous description as important modulators of the p53 pathway genes, either through control of expression levels or function of proteins (Dumont et al., 2003; Bond et al., 2004; Pim and Banks, 2004; Id Said and Malkin, 2015; Moudi et al., 2020). Genotyping was performed using the TaqMan® Genotyping Assay method in a Step One Plus™ Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Carlsbad, USA). The reference SNV numbers included in our analyses, the commercial assay codes of TaqMan® probes employed, and the allelic discrimination of each probe were as

follows: *TP53* rs1042522 [C/G] (c:2403545_10), *MDM2* rs2279744 [T/G] (c:15968533_20), *MIR605* rs2043556 [C/T] (c:11737438_10) and *LIF* rs929271 [G/T] (c:7545904_10). The allelic and genotypic frequencies were determined based on the genotyping results of each group. For allelic frequencies, the number of times an allele was identified in each group (case or control) was divided by the total number of alleles present in each group for each polymorphism (e.g. for 40 individuals in the case group, we had a total of 80 alleles for each polymorphism). The allelic frequencies obtained for each group were compared with the frequencies reported in the Brazilian population (based on the AbraOM database - <http://abraom.ib.usp.br/>) and in populations all over the world (based on the Genome Aggregation Database (gnomAD) and 1000 Genomes Project data obtained from Ensembl database - <https://www.ensembl.org/index.html>). Since the Brazilian population is highly admixed and the individuals in this sample come from different regions of Brazil, we decided not to compare the allelic frequencies with a specific population (e.g. European or Latin American populations), but with data from the world population.

Statistical Analyses

Descriptive analysis of the congenital anomalies was performed in the CZS group. Quantitative variables were tested through the Shapiro-Wilk test to verify their normality and from this, Student's *t* test or Mann-Whitney *U* test were applied to compare the groups. Hardy-Weinberg equilibrium was tested for all SNVs. Categorical variables were compared between groups by Chi-squared Test or Fisher's Exact Test. A *p*-value <0.05 was considered statistically significant. The SPSS® v.20 software (SPSS Inc., Chicago, USA) was used for data handling and for all statistical analyses.

Gene Expression Analyses

In order to better understand the effect of ZIKV infection on the gene expression of *TP53*, *MDM2*, *MIR605* and *LIF*, the expression data of human neuroprogenitor cells exposed and not exposed to ZIKV were evaluated. For this evaluation, the raw data from the study GSE129180 (Liu et al., 2019), available in the Gene Expression Omnibus (GEO) database, were obtained (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/geo/>). **Supplementary Table 1** presents the characteristics of this study.

Raw data from RNA-seq analysis were downloaded from the European Nucleotide Archive (ENA) database (<https://www.ebi.ac.uk/ena/browser/home>) in fastq format and re-processed. The quality control of the samples was evaluated by FastQC tool v.0.11.7 (Andrews, 2010) and they were processed in the Galaxy platform (Afgan et al., 2018). Reads were aligned against the human genome reference sequence (GRCh38) using the short-read aligner Bowtie v1.2.0 or Bowtie2 v2.3.4.3 (Langmead, 2010; Langmead and Salzberg, 2012). The read count was performed with HTseq-count v.0.9.1 (Anders et al., 2015) to estimate the abundance of transcripts expression. The generated outputs were downloaded to be evaluated.

Differential gene expression analysis was performed in R v.3.6.2 applying robust multiaverage (RMA) normalization and using limma package (Ritchie et al., 2015). ZIKV infected cells were compared to non-infected cells. Genes with $|\log_2(\text{fold change})| >$

1.5 or <1.5 and false discovery rate (FDR) <0.05 were considered to be statistically significant and differentially expressed.

RESULTS

The clinical and sociodemographic description of the sample used in this study was previously performed in another study by our group (Gomes et al., 2021). However, we summarize here in **Table 1** the clinical, gestational, and sociodemographic characteristics of both study groups. Mothers of children with CZS had ZIKV infection predominantly in the first trimester of pregnancy (80%) while mothers of children without congenital anomalies reported infection predominantly in the third trimester (44%) (*p*<0.001). Mothers of children with CZS exhibited a lower educational level (*p*<0.001) and lower monthly family incomes compared to mothers of children without congenital malformations (*p*=0.008). Children without CZS had higher weight, height and cephalic perimeter measures compared to with CZS.

Congenital anomalies observed in children with CZS also were previously described in the aforementioned study (Gomes et al., 2021), but they are summarized in **Figure 1**. Detailed dysmorphic, ocular and imaging exams were not carried out on all individuals with CZS, since some research and assistance centers had limited resources to perform such tests. The most prevalent clinical findings were microcephaly (*n*=40, 100%) brain calcifications (*n*=2/24, 92%), cerebral atrophy (*n*=11/12, 92%), lissencephaly (*n*=10/12, 83%), craniofacial disproportion (*n*=15/18, 83%), ventriculomegaly (*n*=8/11, 73%), and ocular alterations (*n*=22/32, 69%).

Figure 2 provides a summary of the proposed relationships among genes and SNVs studied here and their interplay in regulating the p53 pathway. Regarding the allelic and genotypic frequencies of the SNVs selected in *TP53*, *MDM2*, *MIR605* and *LIF*, they were not statistically different between CZS and control groups (**Supplementary Table 2**). Comparing the allelic frequencies obtained in the case and control groups with the frequencies reported in the Brazilian and worldwide population, we observed that they were quite similar (**Supplementary Table 2**), but it is important to note that the Brazilian population is highly admixed (Kehdy et al., 2015), and the allelic and genotypic frequencies of the our population are not always similar to other specific populations.

Allelic frequencies were also compared, within the group of children with CZS, between those who presented or not specific brain malformations, such as intracranial calcification, lissencephaly, cerebral atrophy, hydrocephaly and ocular alterations (information available for more than 12 individuals) (**Supplementary Table 3**). A significant difference in the allelic frequencies of the SNV *TP53* rs1042522 was found between individuals with CZS and lissencephaly or without lissencephaly. Interestingly, we detected the G allele with a frequency lower than expected in individuals with lissencephaly and much higher than expected in individuals without lissencephaly (*p*=0.007) (**Table 2**). Genotypic frequencies were also different between groups, but this difference was tangential to the significance.

TABLE 1 | Evaluation of clinical, gestational, and sociodemographic characteristics in the case (CZS) and control (without CZS) groups.

Variables	Cases ^a (n=40)	Controls (n=48)	p-value ^b
Sex (n, %)			
Male	23 (57%)	26 (54%)	0.754
Female	17 (43%)	22 (46%)	
Ethnicity (n, %)			
Black	31 (77%)	31 (65%)	0.242
White	9 (23%)	17 (35%)	
Weight (kg)	2.5 (2.2 - 2.9)	3.2 (2.8 - 3.5)	<0.001*
Height (cm)	45.0 (44.0 - 48.0)	49.0 (47.0 - 50.0)	0.001*
Cephalic perimeter (cm)	29.0 (27.3 - 31.0)	35.0 (34.0 - 36.0)	<0.001*
Gestational age at birth (weeks)	38.0 (37.0 - 39.0)	38.0 (37.0 - 38.7)	0.522
Types of delivery (n, %)			
Vaginal delivery	16/30 (53%)	5 (10%)	<0.001*
Cesarean section	14/30 (47%)	43 (90%)	
Mother's age (years)	28.0 (22.5 - 35.5)	29.5 (22.0 - 33.0)	0.824
Father's age (years)	28.0 (24.0 - 37.8)	31.0 (26.0 - 35.0)	0.693
Trimester of ZIKV infection (n, %)			
1st	24/30 (80%)	13 (27%)	<0.001*
2nd	4/30 (13%)	14 (29%)	
3rd	2/30 (7%)	21 (44%)	
Exposure during pregnancy (n, %)			
Alcohol	3/35 (9%)	14 (29%)	0.028*
Smoke	0/35	1 (2%)	1.000
Recreational drugs	0/35	1 (2%)	1.000
Maternal yellow fever vaccine (n, %)	18/24 (75%)	35 (73%)	1.000
Maternal educational level (n, %)			
Elementary school	13/38 (34%)	0	<0.001*
High school	13/38 (34%)	2 (4%)	
Incomplete or complete higher education	12/38 (32%)	46 (96%)	
Monthly family income (n, %)			
Less than 3 minimum wages	23/27 (85%)	12/25 (46%)	0.008*
Between 3 and 9 minimum wages	4/27 (15%)	12/25 (46%)	
More than 9 minimum wages	0	2/25 (8%)	

^aIn the case group, some informations were not available or were not answered for all mothers; ^bQuantitative variables were compared between the groups through the Student's t test or Mann-Whitney U test and categorical variables through the Chi-squared test or Fisher's exact test; Quantitative variables are presented as median and quartiles; *Statistically significant.

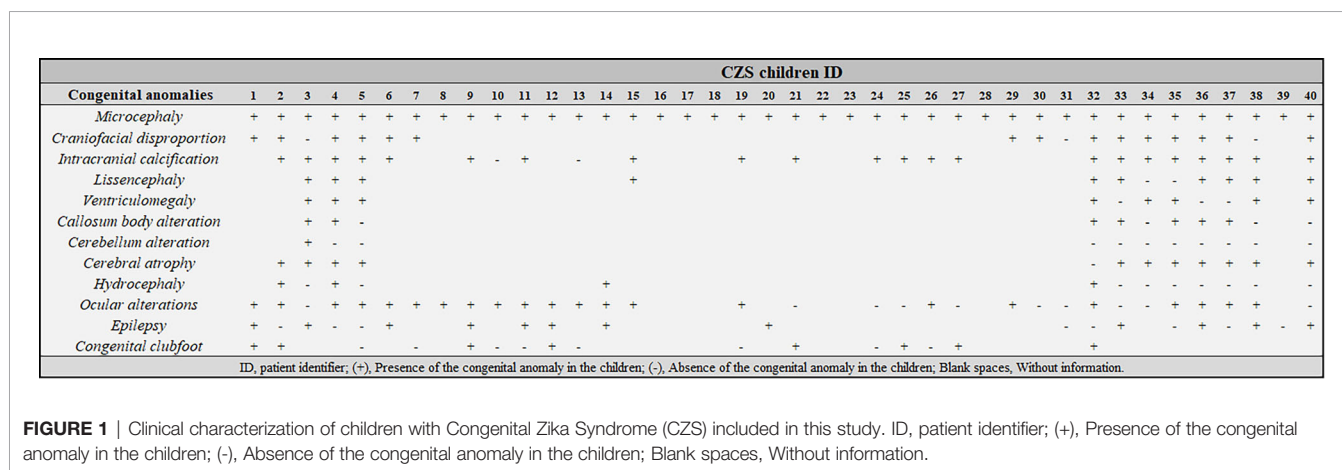


FIGURE 1 | Clinical characterization of children with Congenital Zika Syndrome (CZS) included in this study. ID, patient identifier; (+), Presence of the congenital anomaly in the children; (-), Absence of the congenital anomaly in the children; Blank spaces, Without information.

Gene expression analysis showed an increased expression of *LIF* in human neuroprogenitor cells three days after the infection by the Asian strain of ZIKV, but this association lost its significance after correcting the p-value (logFC = 1.41, p = 0.001, FDR = 0.44). The other genes did not have their expression disturbed by the ZIKV infection (**Supplementary Table 4**).

DISCUSSION

The ability of ZIKV to impair the central nervous system development is still poorly understood. Although it is known that only up to 42% of individuals exposed to ZIKV develop CZS, genetic components related to this susceptibility have not yet been recognized

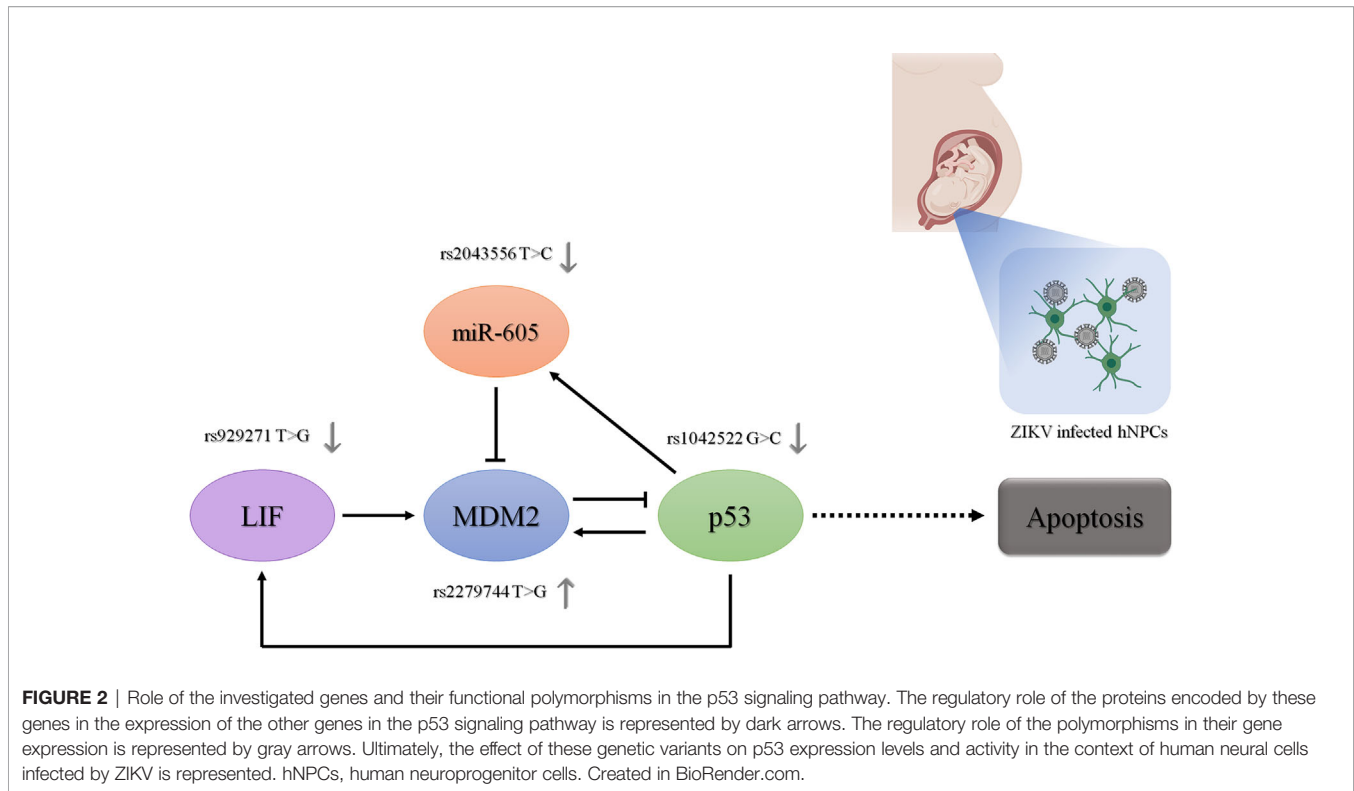


TABLE 2 | Allelic and genotypic frequencies of *TP53* rs1042522 polymorphism in children with CZS and lissencephaly or with CZS and without lissencephaly.

Gene	Polymorphism	Allele/ Genotype	CZS and lissencephaly (n=10) ^a	CZS without lissencephaly (n=2) ^a	<i>P</i> value
TP53 (n, %)	rs1042522 (missense)	C	16 (80%)	0	0.007*
		G	4 (20%)	4 (100%)	
		CC	7 (70%)	0	0.061
		GC	2 (20%)	0	
		GG	1 (10%)	2 (100%)	

^aClinical information was not available for all individuals with CZS. *Statistically significant.

(Nithiyantham and Badawi, 2019). In this study we assessed the role of selected SNVs in p53 pathway genes as potential susceptibility factors to CZS in a sample of Brazilian children exposed to ZIKV during pregnancy. Besides, we evaluated how ZIKV infection deregulates the expression of the same genes in neuroprogenitor cells.

The p53 signaling pathway was chosen for investigation in this study because it has been shown to be affected by ZIKV during infection (El Ghouzzi et al., 2016; Tang et al., 2016; Teng et al., 2017). Similarly, the dysregulation of miRNAs in human neuronal cells during ZIKV infection has also been reported by several studies (Bhagat et al., 2018). Considering these findings and the well-documented miRNA network acting in the direct and indirect regulation of the p53 pathway, we also evaluated in this work an SNV in a miRNA that has been shown to positively regulate p53 activity (Xiao et al., 2011; Hermeking, 2012).

Although we did not find an association between the studied SNVs and susceptibility to CZS, we found a lower frequency of

individuals with CZS and lissencephaly carrying the G-allele of the *TP53* rs1042522 while children without lissencephaly had this allele in homozygosis. Lissencephaly comprises a group of disorders characterized by an abnormally smooth surface of the cerebral cortex due an abnormal neuronal migration, where genes related to the neural migration process are usually mutated (Mochida, 2009). The G-allele of the *TP53* rs1042522 has been associated with higher p53 activity and more potent capacity to induce apoptosis (Dumont et al., 2003). During ZIKV infection, p53 expression has already been shown to be upregulated in an attempt to decrease viral proliferation and eliminate the virus (El Ghouzzi et al., 2016; Tang et al., 2016). In this context, individuals carrying the G allele could have an advantage in viral elimination, with more efficient apoptosis, while those carrying the C allele would allow the virus to spread on a larger scale, impairing the differentiation and activity of a greater number of neural cells. Despite being biologically consistent with the development of an altered phenotype, such as lissencephaly, this result should be interpreted with caution, since this association was identified in a small subset of patients. Therefore, additional case-control studies with a larger sample size and extensive clinical characterization are required to confirm this finding.

The ability of ZIKV infection to affect the expression of p53 pathway genes (El Ghouzzi et al., 2016; Zhang et al., 2016) was one of the main reasons that led to the development of this study. Thus, to evaluate how ZIKV affected the expression of *TP53*, *MDM2*, *MIR605* and *LIF* in hNPCs, we performed an analysis of differential gene expression in exposed cells compared to unexposed cells. The study used for such analysis (Liu et al.,

2019 – GSE129180) was different from those cited as a reference previously (El Ghouzzi et al., 2016 – GSE78711; Zhang et al., 2016 – GSE80434). In this analyze, we found only the upregulation of *LIF* due to ZIKV infection, not corroborating the previously reported findings on *TP53* and *MDM2* (El Ghouzzi et al., 2016; Zhang et al., 2016) and not identifying an alteration in the *MIR605* expression. However, it is important to mention that although the cell type evaluated by these three studies was the same (hNPCs), the differences in the lineage of the ZIKV (Asian or African) and the time of exposure to ZIKV have a strong influence in which genes are affected and how significant is the altered expression. In this sense, we saw that in the study by El Ghouzzi and colleagues (2016) the analysis of the differential gene expression occurred 72 hours after infection by the Asian strain of ZIKV, while in the study by Zhang et al. and colleagues (2016) the evaluation was 64 hours after infection by the Asian strain, and in the study by Liu et al. (2019) the analysis occurred 3 days (72h) and 6 days after infection by the Asian lineage, which means that no study has used the same methodological approaches and, consequently, different results can be expected.

Regarding the gestational and socio-environmental features, the first trimester of ZIKV infection has been associated with the development of more severe congenital anomalies and abortions, while the socioeconomic level, closely related to nutritional and health conditions, could be discussed as a possible risk factor for ZIKV teratogenesis (França et al., 2016; Barbeito-Andrés et al., 2020). In this sense, our study corroborated the previous findings on increased risk to CZS due to ZIKV exposure during the first trimester (França et al., 2016). In addition, our findings suggest that socioeconomic level may be an important risk factor, which deserves to be further explored in the context of ZIKV teratogenesis.

Lastly, this study has some limitations that must be considered in the interpretation of the results, such as the sample size, which affects our power to identify strong associations or to perform more robust statistical analyses. The size of our complete sample is small ($n = 88$) and when subgroup comparisons are made, it becomes even smaller. Thus, considering our sample size and based on studies that have already performed comparisons of allelic frequencies of polymorphisms in samples of individuals exposed to ZIKV during pregnancy (Santos et al., 2019; Gomes et al., 2021), the power of the present study to identify significant associations was approximately 40%. In this sense, we highlight the importance of future studies being carried out on larger samples, making it possible to confirm the associations found by this study, as well as carrying out more robust statistical analyzes, such as the allele size effect. Currently, it is especially difficult to increase the sample size, since fortunately the ZIKV outbreak in Brazil has decreased since 2017. However, it is important to emphasize that this is one of the most largest cohort of children exposed to ZIKV during pregnancy used in the context of studies on genetic susceptibility to ZIKV teratogenesis (Caires-Júnior et al., 2018; Candelo et al., 2019; Santos et al., 2019; Aguiar et al., 2020; Gomes et al., 2021). The lack of detailed data on gestational history and clinical description for some patients is also a

limitation of this study, motivated by the regional variations in available resources during medical consultation. The different origin of the CZS and control groups may also constitute a confounding factor in the study, because the number of cases from each Brazilian region was not matched with the same number of controls for the same region, and, considering that the Brazilian population is a very admixed, it is reasonable to speculate that differential genetic variability between groups might have been observed for that reason and may not strictly related to the development of CZS.

In conclusion, although some studies have described that p53 pathway genes seems to be affected by ZIKV infection and they need attention given to their essential functions in embryonic and fetal development and apoptosis, in the present study we did not find any association between selected variants in genes of this pathway and an increased risk to ZIKV teratogenesis. Importantly, we identified a possible association between *TP53* rs1042522 and the occurrence of lissencephaly in CZS patients, which should be further explored in additional studies. We emphasize that, although biological pathways involved in the teratogenesis of ZIKV have been reported in recent years, additional efforts are still needed to elucidate the main genetic factors implicated in the susceptibility to CZS. Additional case-control and functional studies focusing on both SNVs located in p53 pathway genes and in specific miRNA genes regulating ZIKV-mediated teratogenesis should be performed on individuals exposed to ZIKV in order to better understand their role in the CZS development.

DATA AVAILABILITY STATEMENT

The raw data supporting the conclusions of this article will be made available by the authors, without undue reservation.

ETHICS STATEMENT

This study involved human participants and, therefore, was reviewed and approved by Ethics and Research Committee of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre - nº 170619 – CAAE 78735817910015327. Written informed consent to participate in this study was provided by the participants' legal guardian/next of kin.

AUTHOR CONTRIBUTIONS

JAG, LS-F, and FSLV: conceptualization of the study. JAG, ES, IAV, ACPTT, JHS, BFRR, MFG, TMO, MDFCA, and IFC: acquisition, analysis, and interpretation of the data. JAG: writing—original draft preparation. JAG, LRF, PA-P, LS-F, and FSLV: writing—review and editing. JAG, LS-F, and FSLV: supervision, project administration and funding acquisition. All authors contributed to the article and approved the submitted version.

FUNDING

This work was supported by the Instituto Nacional de Genética Médica Populacional (INAGEMP) [grant number CNPq 573993/2008-4, FAPERGS 17/2551.0000521-0], Fundo de Incentivo a Pesquisa e Eventos (FIPE) of the Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) [grant numbers 2017-0619, 2019-0295], Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico [grant numbers 424362/2018-0 and Chamada CNPq/CAPES/MS-14/2016]. FSLV is recipient of a CNPq scholarship grant [grant number CNPq 312993/2017-0]. PA-P is recipient of a CNPq scholarship grant [grant number CNPq 307826/2017-1].

REFERENCES

- Afgan, E., Baker, D., Batut, B., van den Beek, M., Bouvier, D., Cech, M., et al. (2018). The Galaxy Platform for Accessible, Reproducible and Collaborative Biomedical Analyses: 2018 Update. *Nucleic Acids Res.* 46, W537–W544. doi: 10.1093/nar/gky379
- Aguiar, R. S., Pohl, F., Morais, G. L., Nogueira, F. C. S., Carvalho, J. B., Guida, L., et al. (2020). Molecular Alterations in the Extracellular Matrix in the Brains of Newborns With Congenital Zika Syndrome. *Sci. Signal.* 13, eaay6736. doi: 10.1126/scisignal.aay6736
- Anders, S., Pyl, P. T., and Huber, W. (2015). HTSeq—a Python Framework to Work With High-Throughput Sequencing Data. *Bioinformatics* 31, 166–169. doi: 10.1093/bioinformatics/btu638
- Andrews, S. (2010) *FastQC: A Quality Control Tool for High Throughput Sequence Data*. Available at: <http://www.bioinformatics.babraham.ac.uk/projects/fastqc>.
- Barbeito-Andrés, J., Pezzuto, P., Higa, L. M., Dias, A. A., Vasconcelos, J. M., Santos, T. M. P., et al. (2020). Congenital Zika Syndrome is Associated With Maternal Protein Malnutrition. *Sci. Adv.* 6, eaaw6284. doi: 10.1126/sciadv.aaw6284
- Bayless, N. L., Greenberg, R. S., Swigut, T., Wysocka, J., and Blish, C. A. (2016). Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe* 20, 423–428. doi: 10.1016/j.chom.2016.09.006
- Bhagat, R., Prajapati, B., Narwal, S., Agnihotri, N., Adlakha, Y. K., Sen, J., et al. (2018). Zika Virus E Protein Alters the Properties of Human Fetal Neural Stem Cells by Modulating microRNA Circuitry. *Cell Death Differ.* 25, 1837–1854. doi: 10.1038/s41418-018-0163-y
- Bond, G. L., Hu, W., Bond, E. E., Robins, H., Lutzker, S. G., Arva, N. C., et al. (2004). A Single Nucleotide Polymorphism in the MDM2 Promoter Attenuates the p53 Tumor Suppressor Pathway and Accelerates Tumor Formation in Humans. *Cell* 119, 591–602. doi: 10.1016/j.cell.2004.11.022
- Caires-Júnior, L. C., Goulart, E., Melo, U. S., Araujo, B. H. S., Alvizi, L., Soares-Schanoski, A., et al. (2018). Discordant Congenital Zika Syndrome Twins Show Differential In Vitro Viral Susceptibility of Neural Progenitor Cells. *Nat. Commun.* 9, 475. doi: 10.1038/s41467-017-02790-9
- Candelo, E., Cochard, L., Caicedo-Herrera, G., Granados, A. M., Gomez, J. F., Diaz-Ordoñez, L., et al. (2019). Syndromic Progressive Neurodegenerative Disease of Infancy Caused by Novel Variants in HIBCH: Report of Two Cases in Colombia. *Intractable Rare Dis. Res.* 8, 187–193. doi: 10.5582/irdr.2019.01014
- del Campo, M., Feitosa, I. M. L., Ribeiro, E. M., Horovitz, D. D. G., Pessoa, A. L. S., França, G. V. A., et al. (2017). The Phenotypic Spectrum of Congenital Zika Syndrome. *Am. J. Med. Genet. A* 173, 841–857. doi: 10.1002/ajmg.a.38170
- Dumont, P., Leu, J. I. J., Della Pietra, A. C., George, D. L., and Murphy, M. (2003). The Codon 72 Polymorphic Variants of p53 Have Markedly Different Apoptotic Potential. *Nat. Genet.* 33, 357–365. doi: 10.1038/ng1093
- El Ghouzzi, V., Bianchi, F. T., Molineris, I., Mounce, B. C., Berto, G. E., Rak, M., et al. (2016). ZIKA Virus Elicits P53 Activation and Genotoxic Stress in Human Neural Progenitors Similar to Mutations Involved in Severe Forms of Genetic Microcephaly and P53. *Cell Death Dis.* 7, e2440. doi: 10.1038/cddis.2016.266

ACKNOWLEDGMENTS

We appreciate all parents and children for their participation in this study. We thank BioRender, a web-based tool for life-science and medical illustration, by the images provided to **Figure 2** (<https://biorender.com>).

SUPPLEMENTARY MATERIAL

The Supplementary Material for this article can be found online at: <https://www.frontiersin.org/articles/10.3389/fcimb.2021.641413/full#supplementary-material>

- França, G. V. A., Schuler-Faccini, L., Oliveira, W. K., Henriques, C. M. P., Carmo, E. H., Pedi, V. D., et al. (2016). Congenital Zika Virus Syndrome in Brazil: A Case Series of the First 1501 Livebirths With Complete Investigation. *Lancet* 388, 891–897. doi: 10.1016/S0140-6736(16)30902-3
- Gomes, J. A., Sgarioni, E., Boquett, J. A., Terças-Trettel, A. C. P., da Silva, J. H., Ribeiro, B. F. R., et al. (2021). Association Between Genetic Variants In NOS2 And TNF Genes With Congenital Zika Syndrome and Severe Microcephaly. *Viruses* 13, 325. doi: 10.3390/v13020325
- Hermeking, H. (2012). MicroRNAs in the p53 Network: Micromanagement of Tumour Suppression. *Nat. Rev. Cancer* 12, 613–626. doi: 10.1038/nrc3318
- Id Said, B., and Malkin, D. (2015). A Functional Variant in miR-605 Modifies the Age of Onset in Li-Fraumeni Syndrome. *Cancer Genet.* 208, 47–51. doi: 10.1016/j.cancergen.2014.12.003
- Kehdy, F. S., Gouveia, M. H., Machado, M., Magalhães, W. C., Horimoto, A. R., Horta, B. L., et al. (2015). Origin and Dynamics of Admixture in Brazilians and its Effect on the Pattern of Deleterious Mutations. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 112, 8696–8701. doi: 10.1073/pnas.1504447112
- Langmead, B. (2010). Aligning Short Sequencing Reads With Bowtie. *Curr. Protoc. Bioinformatics* Chapter 11, Unit 11.7. doi: 10.1002/0471250953.bi1107s32
- Langmead, B., and Salzberg, S. L. (2012). Fast Gapped-Read Alignment With Bowtie 2. *Nat. Methods* 9, 357–359. doi: 10.1038/nmeth.1923
- Liu, G., and Chen, X. (2006). Regulation of the p53 Transcriptional Activity. *J. Cell. Biochem.* 97, 448–458. doi: 10.1002/jcb.20700
- Liu, L., Chen, Z., Zhang, X., Li, S., Hui, Y., Feng, H., et al. (2019). Protection of ZIKV Infection-Induced Neuropathy by Abrogation of Acute Antiviral Response in Human Neural Progenitors. *Cell Death Differ.* 26, 2607–2621. doi: 10.1038/s41418-019-0324-7
- Liu, J., Yu, H., and Hu, W. (2015). LIF Is a New p53 Negative Regulator. *J. Nat. Sci.* 1, e131.
- Mochida, G. H. (2009). Genetics and Biology of Microcephaly and Lissencephaly. *Semin. Pediatr. Neurol.* 16, 120–126. doi: 10.1016/j.spen.2009.07.001
- Moudi, M., Sargazi, S., Heidari Nia, M., Saravani, R., Shirvaliloo, M., and Shakiba, M. (2020). Polymorphism in the 3'-UTR of LIF But Not in the ATF6B Gene Associates With Schizophrenia Susceptibility: A Case-Control Study and In Silico Analyses. *J. Mol. Neurosci.* 70, 2093–2101. doi: 10.1007/s12031-020-01616-6
- Nithiyantham, S. F., and Badawi, A. (2019). Maternal Infection With Zika Virus and Prevalence of Congenital Disorders in Infants: Systematic Review and Meta-Analysis. *Can. J. Public Heal.* 110, 638–648. doi: 10.17269/s41997-019-00215-2
- Pim, D., and Banks, L. (2004). p53 Polymorphic Variants at Codon 72 Exert Different Effects on Cell Cycle Progression. *Int. J. Cancer* 108, 196–199. doi: 10.1002/ijc.11548
- Ritchie, M. E., Phipson, B., Wu, D., Hu, Y., Law, C. W., Shi, W., et al. (2015). Limma Powers Differential Expression Analyses for RNA-Sequencing and Microarray Studies. *Nucleic Acids Res.* 43, e47. doi: 10.1093/nar/gkv007
- Santos, C. N. O., Ribeiro, D. R., Cardoso Alves, J., Cazzaniga, R. A., Magalhães, L. S., de Souza, M. S. F., et al. (2019). Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the Rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and Rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *J. Infect. Dis.* 220, 1797–1801. doi: 10.1093/infdis/jiz392

- Tang, H., Hammack, C., Ogden, S. C., Wen, Z., Qian, X., Li, Y., et al. (2016). Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18, 587–590. doi: 10.1016/j.stem.2016.02.016
- Teng, Y., Liu, S., Guo, X., Liu, S., Jin, Y., He, T., et al. (2017). An Integrative Analysis Reveals a Central Role of P53 Activation Via MDM2 in Zika Virus Infection Induced Cell Death. *Front. Cell. Infect. Microbiol.* 7, 327. doi: 10.3389/fcimb.2017.00327
- Xiao, J., Lin, H., Luo, X., Luo, X., and Wang, Z. (2011). MiR-605 Joins p53 Network to Form a P53:miR-605:Mdm2 Positive Feedback Loop in Response to Stress. *EMBO J.* 30, 524–532. doi: 10.1038/emboj.2010.347
- Zhang, F., Hammack, C., Ogden, S. C., Cheng, Y., Lee, E. M., Wen, Z., et al. (2016). Molecular Signatures Associated With ZIKV Exposure in Human Cortical Neural Progenitors. *Nucleic Acids Res.* 44, 8610–8620. doi: 10.1093/nar/gkw765

Conflict of Interest: The authors declare that the research was conducted in the absence of any commercial or financial relationships that could be construed as a potential conflict of interest.

Copyright © 2021 Gomes, Sgarioni, Vieira, Fraga, Ashton-Prolla, Terças-Tretell, da Silva, Ribeiro, Galera, de Oliveira, Carvalho de Andrade, Carvalho, Schuler-Faccini and Vianna. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License (CC BY). The use, distribution or reproduction in other forums is permitted, provided the original author(s) and the copyright owner(s) are credited and that the original publication in this journal is cited, in accordance with accepted academic practice. No use, distribution or reproduction is permitted which does not comply with these terms.

CAPÍTULO IX

Artigo 6

A polymorphism (rs531564) in the gene encoding miR-124 may contribute to the occurrence of Congenital Zika Syndrome

Em preparação - A ser submetido na Epigenetics

CAPÍTULO X

Artigo 7

Case report: Whole-exome analysis in discordant twins for Congenital Zika Syndrome

Em preparação - A ser submetido na Clinical Genetics

CAPÍTULO XI

Artigo 8

Genetic susceptibility in Congenital Zika Syndrome: a systematic literature review and whole-exome sequencing of a case series with microcephaly

Em preparação - A ser submetido na Human Molecular Genetics

PARTE III - Especulação sobre o papel do ZIKV em transtornos do neurodesenvolvimento

CAPÍTULO XII

Artigo 9

Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder:
Neuroimmunological Aspects

Publicado na Neuroimmunomodulation

Zika Virus as a Possible Risk Factor for Autism Spectrum Disorder: Neuroimmunological Aspects

Priscila Vianna^{a, b} Julia do Amaral Gomes^{a, b, d} Juliano André Boquett^{a, b}
Lucas Rosa Fraga^{b, c, f} Jaqueline Bohrer Schuch^e Fernanda Sales Luiz Vianna^{a–d}
Lavínia Schuler-Faccini^{a–c}

^aDepartment of Genetics, Institute of Biosciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil; ^bNational Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP), Porto Alegre, Brazil; ^cBrazilian Teratogen Information Service (SIAT), Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil; ^dGenomic Medicine Laboratory, Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), Porto Alegre, Brazil; ^eGraduate Program in Biomedical Gerontology, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS), Porto Alegre, Brazil; ^fDepartment of Morphological Sciences, Institute of Health Sciences, Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), Porto Alegre, Brazil

Keywords

Zika virus · Neuroimmunomodulation · Inflammation · Autism

Abstract

The recent outbreak of the Zika virus (ZIKV) and the discovery that perinatal Zika exposure can lead to the Congenital Zika Syndrome has promoted a call for prevention measures. Due to the increased number of babies born with microcephaly, structural brain abnormalities, and neurological alterations in regions affected by ZIKV, investigations were carried out in order to better understand this process. The maternal immune system directly influences the fetal central nervous system, and complications during pregnancy have been associated with neurodevelopmental disorders. Autism spectrum disorder (ASD), a neurodevelopmental disorder commonly manifested in the first years of life, is a disease with multifactorial etiology and is manifested typi-

cally by social and communication impairments, as well as stereotyped behaviors. Brain abnormalities, including both anatomically and functionally, can be observed in this disorder, suggesting delays in neuronal maturation and altered brain connectivity. It is known that some viral congenital infections, such as rubella, and cytomegalovirus can interfere with brain development, being associated with brain calcification, microcephaly, and ASD. Here, we reviewed a range of studies evaluating the aspects concerning brain development, immunological status during pregnancy, and neuroimmunomodulation in congenital viral infections, and we discuss if the fetal brain infection caused by ZIKV could predispose to ASD. Finally, we suggest a mechanism encompassing neurological and immunological pathways that could play a role in the development of ASD in infants after ZIKV infection in pregnancy.

© 2019 S. Karger AG, Basel

P.V. and J.A.G. contributed equally to this article.

Congenital Zika Syndrome

In early 2015, a Zika virus (ZIKV) outbreak was identified in the northeastern region of Brazil [1], followed by reports of an increased number of children born with severe microcephaly in Brazil in the same geographic area [2]. In 2016, after assessing several cases and reviewing criteria of teratogenesis, ZIKV was confirmed as a new teratogen in humans and responsible for the increase in the number of microcephaly cases in Brazil [3–5]. ZIKV teratogenesis affects mainly the central nervous system (CNS), presenting marked microcephaly with significant craniofacial disproportion, cortical malformations, and intracranial calcifications among other symptoms [4, 6, 7]. Nonetheless, a proportion of babies born with a head circumference within the normal range (>33 cm for term boys and girls) may present cerebral and neurological abnormalities [8]. Several studies have focused on the identification of the mechanisms and pathways involved in ZIKV infection outcomes during pregnancy. In this work, we reviewed the embryologic and immunologic aspects during CNS development and ZIKV embryopathy. Finally, we suggest a mechanism encompassing neurological and immunological pathways that could play a role in the development of autism spectrum disorder (ASD) in infants after ZIKV infection in pregnancy.

Normal Neurodevelopment

The development of the CNS begins from the third week of gestation with the formation of the neural plate, which is a thickening of the embryonic ectoderm along the rostral-caudal midline. Differentiation of all embryonic stem cell lines involves complex cascades of molecular signaling. The interaction between expression of some genes and exposure to certain environmental factors contributes to this process [9].

The neural tube develops in the fourth week in the embryo's life. Initially, this structure contains only a single cell layer that surrounds a central canal. Neural progenitor cells are initially located adjacent to the central canal (i.e., future ventricular system) in the ventricular zone (VZ) [10]. Production of neurons involves the increase of the neural progenitor cell population [11]. In the developing brain, the division of this population of cells is asymmetric, leading to the formation of 2 different types of cells: neural progenitor cells and neurons. Progenitor cells stay in the proliferative zone, whilst neurons migrate radially from this area (most being produced in the VZ)

to the center of the brain out to the developing neocortex [10].

As development proceeds, the brain becomes larger and the distance between the VZ and the most external layer increases. Hence, the mode of neuronal migration changes and the neurons use the radial glial guides to support their migration [12]. Radial glial guides extend a basal process that attaches to the pial surface of the brain, and the neurons use such processes as scaffolding to their migration [13]. The result of this orderly fashioned migration is that the neocortex has a structure of 6 well-defined layers. Initially, the brain is a smooth “lissencephalic” structure. Gradually, the increase in neuronal production and migration leads to an increase in its mass and area, and the brain develops the characteristic mature pattern of gyral and sulcal folding.

ZIKV Infection during Pregnancy and Its Effects

Infections during pregnancy can alter the embryo/fetal environment through maternal fever, dehydration, stress, nutritional impairment, and other related symptoms. It is known that a fraction of placental damage is caused by infections, and approximately half of all preterm births are associated with histological evidence of placental inflammation [14].

An increased number of babies born with microcephaly and neurological alterations in regions affected by ZIKV [15], as well as the emergence of the hypothesis involving a teratogenic effect of the virus infection [4], triggered several investigations in order to test the association between these 2 outcomes. Evidence linking ZIKV infection and brain abnormalities was observed through the detection of the virus in children exposed during pregnancy, including presence of viral RNA and antigens in the brain tissues and in placental tissues of early miscarriages [16, 17]. Studies in mice infected with ZIKV found damage in the fetal CNS cells with maternal-fetal transmission through the placenta and tropism of the virus to cells in the cerebral cortex, including neural progenitor cells [18, 19].

It is known that cortical, ocular, and migratory disorders are some of the main characteristics observed, the occurrence of these and other malformations being dependent on the gestational period in which the mother was infected by ZIKV [7, 20]. There is a peculiar phenotype in affected babies, characterized by severe microcephaly with significant craniofacial disproportion, overlapping sutures, prominent occipital bone, destruction of

the cerebral cortex, ventriculomegaly, cerebellar hypoplasia, intracranial calcifications, ophthalmic anomalies, and disorders of neuronal migration, such as lissencephaly and pachygyria. Severe neurological abnormalities and arthrogryposis are consequences of the prenatal cortical destruction [6, 7]. These anomalies are the result of a sequence of events already described as the “Fetal Brain Disruption Sequence” [21], where the sudden destruction of the brain is followed by skull collapse. The term Congenital Zika Syndrome was coined [7, 22].

However, this phenotype is now considered only “the tip of the iceberg” and there is a spectrum of less severe abnormalities after congenital Zika infection. There is a significant number of children born with a head circumference within the normal range presenting a range of abnormalities, including postnatal microcephaly, brain calcifications, ophthalmic abnormalities, seizures, and other neurological dysfunctions. At the present moment, it is too early to assess cognitive abilities in these children [6, 23, 24]. Adams et al. [25], in a study in macaques, have demonstrated that even in the absence of microcephaly, the teratogenic action of ZIKV infection in the fetal brain is substantial and has long-lasting effects. These effects on the fetal brain include loss of fetal noncortical brain volume, injury to the ependymal epithelium, and loss of late fetal neuronal progenitor cells. Another study with macaques also described the long-lasting effects of ZIKV infection on behavior, brain structure and functions [26].

Pregnancy and the Immune System

Successful pregnancy depends on a constant balance between maternal and fetal modulators, playing roles in uterine quiescence, membrane integrity, and cervical competence [27]. The fetus is in intimate contact with the maternal immune system, being exposed to a range of substances ingested from the amniotic fluid, such as food antigens, microbes, and even maternal cell antigens [28–31]. Since the fetus represents a semi-allogeneic graft to the maternal organism, it expresses paternal inherited antigens that make it a potential target for maternal immunity. The idea of maternal-fetal tolerance was first recognized and discussed by Medawar [32] in 1953. In this sense, regulatory and suppressive immunological mechanisms are usually put into action in an attempt to avoid rejection of the fetus. As an example of immune modulation during pregnancy, the maternal inflammatory cytokine profile Th1/Th2/Th17 is altered, allowing the correct fetal development and survival [33].

The initial phase of pregnancy (first trimester) is marked by an inflammatory immune profile favoring embryo implantation and angiogenesis [33, 34]. After this, the inflammatory maternal immune response should be continuously suppressed. For this, regulatory cytokines (e.g., IL-10) induce the expression of suppressive molecules in the trophoblast [35]. In addition, the Th17 and Treg cells regulate the immune system during pregnancy [36]. However, the process of immunomodulation during pregnancy may facilitate opportunistic infections that take advantage of this field.

The fetal immune system presents a strong innate immune response with antimicrobial properties able to inhibit bacterial colonization of the placenta [37]. Moreover, in the first trimester of pregnancy, the human fetus presents an immune response with the presence of CD4+ and CD8+ T cells produced by the fetal thymus [38, 39]. An abundant and functional pool of FOXP3+ T-regulatory cells is also found in fetal lymphoid tissues [40]. Figure 1 represents a timeline of key events in the neurodevelopment of the fetus as well as the maternal immune system.

Prenatal Adversities, Viral Infections, and ASD

Immune adversities during pregnancy are often associated with fetal growth restriction and compensations in other organs in an attempt to protect the fetal brain development [41–43]. Complications during pregnancy can decrease the fetal blood supply, resulting in the shunt of blood from the peripheral organs to the CNS. The presence of maternal inflammation and infection was associated with alterations in brain development and behavior disorders in the fetus [44, 45]. Proinflammatory cytokines damage oligodendrocytes during critical periods of brain development, which can result in perinatal inflammation and can contribute to the pathogenesis of brain lesions [46]. In relation to infections, it is known that some pathogens, such as STORCH (an acronym for syphilis, *Toxoplasma gondii*, rubella, cytomegalovirus, and herpes viruses), can alter brain development and are associated with alterations, such as brain calcifications, microcephaly, and neurodevelopmental disorders [47–49].

Altogether, evidence suggests that these complications during pregnancy are associated with neurodevelopmental disorders such as ASD [50]. ASD is commonly manifested in the first years of life and involves social and communication impairments, as well as stereotyped behaviors. Brain abnormalities, both anatomic and functional,

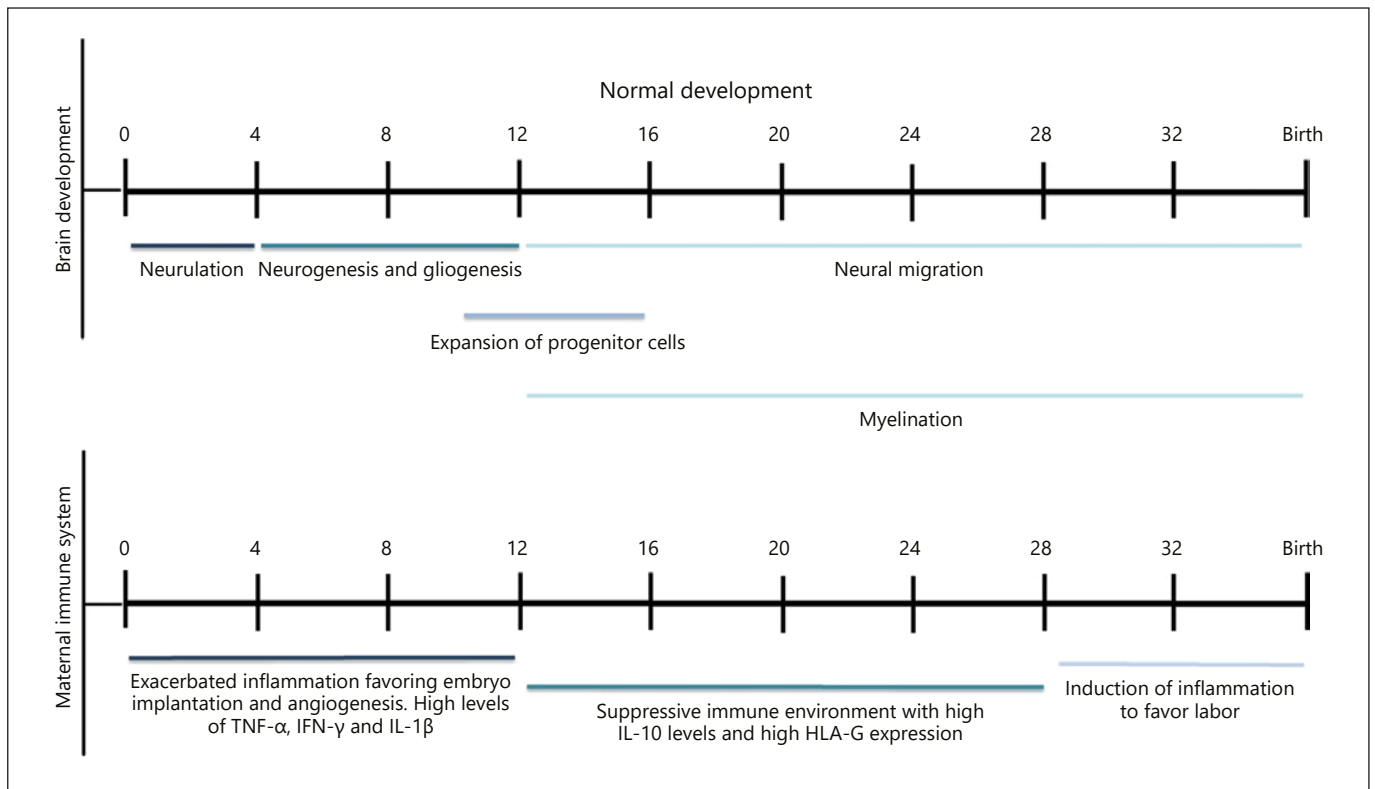


Fig. 1. Normal neurodevelopment. Each gestational week is marked by different events of neuromaturation and immunological responses in order to ensure the correct development of the brain of the fetus. The maternal immune system adopts proinflammatory and anti-inflammatory characteristics at the different trimesters of pregnancy that promote fetus survival and development.

are present in this disorder, suggesting delays in neuronal maturation and altered brain connectivity [51]. The mainly anatomical characteristics observed in ASD patients include dysplasias in the hippocampus, cerebellum, and neocortex; gray and white matter disorganization [52]; reduced volume of the corpus callosum regions and hippocampus [53], and abnormal patterns of cortical thickness [51, 54].

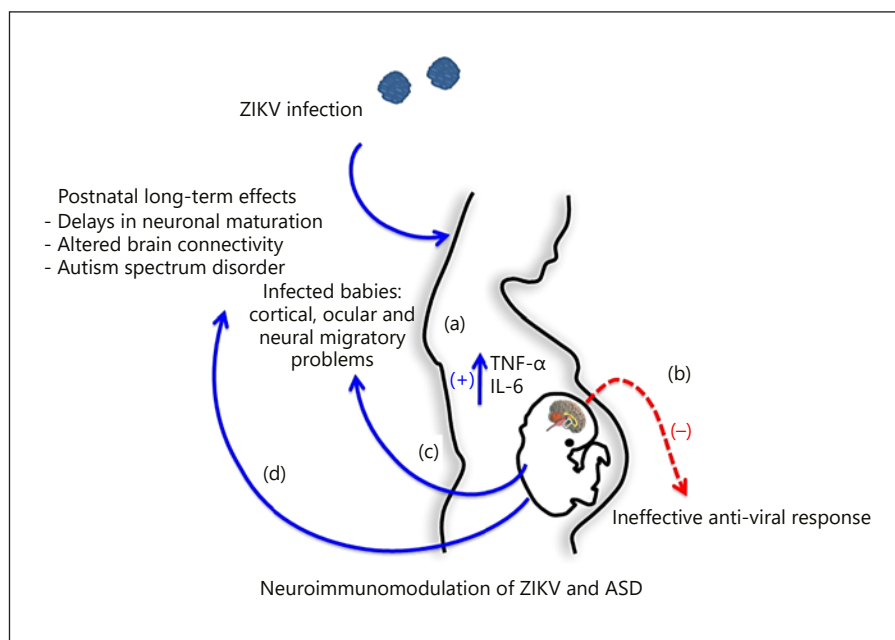
There is a range of genetic and environmental factors contributing to the susceptibility of the majority of ASD cases. Studies have indicated a tight relationship between the nervous and immune systems, acting as a neuro-immune network and influencing many mental disorders. The CNS can regulate the immune system through neuronal and hormonal pathways, and the immune system can influence the nervous system via cytokine production. In this sense, cytokines and chemokines can modulate brain function as well as influence the neurogenesis process, acting in response to infections, injuries, and inflammation.

Neuroinflammatory Responses and ASD

During an initial immune response, the recognition of pathogenic antigens triggers inflammatory processes, releasing proinflammatory cytokines such as TNF- α and IL-6 [46]. For instance, TNF- α may regulate the dopaminergic differentiation as well as the apoptosis of neurons, leading to impaired fetal brain function [55]. Experimental studies demonstrated that CNS inflammation, due to cytokine production by the mother and/or child, may modify the activity of brain regions, such as the hippocampus [56].

Inflammatory response in the CNS mediated by microglial cells plays a role in neuronal damage and removes damaged cells by phagocytosis. In ASD, the number of activated microglial cells seems to be increased [57]. Alterations in synaptic and dendritic organization and neurotransmission were also observed [50]. Considering previous evidence linking autism to maternal infections and inflammatory profile, we suggest a robust association be-

Fig. 2. Model of neuroimmunomodulation of ZIKV infection and ASD: (a) during the initial immune response against ZIKV infection, an inflammatory response is triggered with the release of proinflammatory cytokines, such as IL-6 and TNF- α ; (b) the exacerbated inflammatory response against the virus may compromise viral elimination; (c) among the malformations observed in the affected babies (e.g., ocular), some have already been associated with an exacerbated inflammatory process; (d) we hypothesized whether the ZIKV infection process may generate long-term neuropathological effects in the infected mother's children, including the onset of neurodevelopmental disorders, such as ASD, since an exacerbated inflammatory process and the cytokines IL-6 and TNF- α (released in response to ZIKV) have already been associated with ASD. ZIKV, Zika virus; ASD, autism spectrum disorder; IL-6, interleukin-6; TNF- α , tumor necrosis factor alpha.



tween the immune system and ASD. In this sense, some studies have demonstrated increased cytokine levels in children with ASD [58–60]. IL-6 has been involved in several psychiatric disorders beyond autism. High levels of IL-6 were observed in the anterior cingulate gyrus, in the frontal cortices and cerebellum of ASD patients and could mediate autistic-like behaviors [61–63]. A mouse model of autism is associated with increased production of IL-6, and the inhibition of exacerbated IL-6 production improves the sociability behavior in those mice [64]. Another mouse model of autism covers a situation of maternal infection and is marked by immune dysregulation and autistic-like symptoms in the offspring [65]. The administration of an anti-IL-6 antibody prevents these behavioral changes [66].

Other cytokines are also associated with autism and/or autistic-like behaviors. Postmortem sampling of the brain also identified increased levels of TNF- α in patients with ASD [60]. Additionally, proinflammatory cytokines have been associated with deficits in the ASD core symptoms [58, 67]. Previous studies observed alterations in the expression of toll-like receptors (TLRs), NF- κ B, IL-27, IL-17A, IL-10, and Foxp3 in BTBR mice – an experimental model for autism. These animals present repetitive behaviors and social deficits similar to those observed in children with ASD. After treatment with an adenosine A2A receptor agonist (a potential drug for immune, inflammatory, and neurodegenerative diseases), attenuated

changes in behavior and expression of proinflammatory mediators were observed [68, 69]. Also, another study reported lower levels of IL-2, IL-6, IL-9, interferon (IFN)- γ , and TNF- α , as well as higher levels TGF- β , in BTBR mice following adenosine A2A receptor stimulation [70].

Neuroimmunomodulation of ASD and ZIKV

The inflammatory and immunological responses against ZIKV infection in pregnant women are of great interest since it is known that the presence of the virus in the CNS cells triggers the destruction of all adjacent tissue, causing cell death. It is not well understood how the immune system response to ZIKV infection is regulated. However, it is recognized that the inflammatory process triggered in an attempt to control the infection acts in both a beneficial and harmful way to the infective organism. Here, we discuss whether the inflammatory response to ZIKV infection and the brain damage caused by the virus in affected babies could favor the development of neurodevelopmental disorders such as ASD (Fig. 2). To support our theory, some points must be considered: (a) it is important to know the effects of the neuroimmunoregulation after virus infection; (b) we wonder whether the process of death of CNS cells infected by ZIKV and, consequently, tissue damage occurs due to the release of inflammatory mediators or (c) through direct lysis of the

infected cells during the immune response against the virus. In this way, the tissue destruction would occur through the immune system's own cells lysing the infected target cells. It is well known that IL-6 is a key cytokine involved in autism [61]. Considering the facts above, little is known about the neuropathogenesis of ZIKV. ZIKV is able to reach the fetal neural cells when it crosses the fetal barrier through infection of cytotrophoblasts or transmigration of infected primary human placental macrophages. After virus infection, the human placental macrophages try to eliminate the virus by secreting type I IFNs; however, the cells remain permissive to viral replication.

Hamel et al. [71] have identified the TLR3 as the initial immune receptor involved in the sensing of ZIKV infection in human fibroblasts leading to type I and type II IFN responses. Olganier et al. [72] have suggested that the viral infection of fetal neural progenitor cells could activate TLR3 immune responses, leading to a deregulation of genes that control apoptosis, resulting in severe damage to the embryonic brain. All of these inflammatory issues are relevant when it comes to a viral infection since the immune system may respond differently. Moreover, in the case of ZIKV, previous infections with other flaviviruses, such as dengue virus and yellow fever, may trigger a secondary immune response of differential magnitude

given the great molecular similarity of some immunogenic epitopes among these correlated viruses.

The understanding of normal neurodevelopment and its comparison with neuropathogenesis during ZIKV infection are extremely relevant issues, not only for the identification of virus target cells but also for the identification of which structural, cognitive, motor, and behavioral damages are expected. It is known that ZIKV infection can occur at any time during pregnancy, and therefore at any point in development, causing harm to the baby to a greater or lesser extent. It is important to evaluate the long-term effects of ZIKV infection and its correlation with neurodevelopmental disorders, such as ASD.

Disclosure Statement

The authors declare no conflicts of interest.

Funding Sources

This work was supported by National Institute of Population Medical Genetics (INAGEMP) grants CNPq 573993/2008-4; CNPq/CAPES/MS (No. 14/2016 – Preventing and Combating the Zika Virus) and Coordenação de Aperfeiçoamento Pessoal de Nível Superior (CAPES, Finance Code 001).

References

- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis*. 2015 Oct;21(10):1885–6.
- Oliveira Melo AS, Malinger G, Ximenes R, Szejnfeld PO, Alves Sampaio S, Bispo de Filipis AM. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound Obstet Gynecol*. 2016 Jan;47(1):6–7.
- Rasmussen SA, Jamieson DJ, Honein MA, Petersen LR. Zika Virus and Birth Defects—Reviewing the Evidence for Causality. *N Engl J Med*. 2016 May;374(20):1981–7.
- Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, et al.; Brazilian Medical Genetics Society—Zika Embryopathy Task Force. Possible Association between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Jan;65(3):59–62.
- Schuler-Faccini L, Sanseverino M, Vianna F, da Silva AA, Larrandaburu M, Marcolongo-Pereira C, et al. Zika virus: A new human teratogen? Implications for women of reproductive age. *Clin Pharmacol Ther*. 2016 Jul;100(1):28–30.
- van der Linden V, Pessoa A, Dobyns W, Barokovich AJ, Júnior HV, Filho EL, et al. Description of 13 Infants Born during October 2015-January 2016 with Congenital Zika Virus Infection without Microcephaly at Birth - Brazil. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Dec;65(47):1343–8.
- Del Campo M, Feitosa IM, Ribeiro EM, Horovitz DD, Pessoa AL, França GV, et al.; Zika Embryopathy Task Force-Brazilian Society of Medical Genetics ZETF-SBGM. The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet A*. 2017 Apr;173(4):841–57.
- França GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, et al. Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet*. 2016 Aug;388(10047):891–7.
- Stiles J. The fundamentals of brain development: Integrating nature and nurture. Cambridge (MA): Harvard University Press; 2008.
- Stiles J, Jernigan TL. The basics of brain development. *Neuropsychol Rev*. 2010 Dec;20(4):327–48.
- Wodarz A, Huttner WB. Asymmetric cell division during neurogenesis in Drosophila and vertebrates. *Mech Dev*. 2003 Nov;120(11):1297–309.
- Rakic P. Mode of cell migration to the superficial layers of fetal monkey neocortex. *J Comp Neurol*. 1972 May;145(1):61–83.
- Nadarajah B, Parnavelas JG. Modes of neuronal migration in the developing cerebral cortex. *Nat Rev Neurosci*. 2002 Jun;3(6):423–32.
- Chatterjee A, Chartrand SA, Harrison CJ, Feltz-Duckworth A, Bewtra C. Severe intrauterine herpes simplex disease with placentitis in a newborn of a mother with recurrent genital infection at delivery. *J Perinatol*. 2001 Dec;21(8):559–64.
- Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WT, do Carmo GM, Henriques CM, Coelho GE, et al. Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep*. 2016 Mar;65(9):242–7.

- 16 Martines RB, Bhatnagar J, de Oliveira Ramos AM, Davi HP, Iglezias SD, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet*. 2016 Aug;388(10047):898–904.
- 17 Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. *N Engl J Med*. 2016 Mar;374(10):951–8.
- 18 Cugola FR, Fernandes IR, Russo FB, Freitas BC, Dias JL, Guimarães KP, et al. The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature*. 2016 Jun;534(7606):267–71.
- 19 Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, et al. Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell*. 2016 May;165(5):1081–91.
- 20 Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, et al. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med*. 2016 Dec;375(24):2321–34.
- 21 Russell LJ, Weaver DD, Bull MJ, Weinbaum M, Opitz JM. In utero brain destruction resulting in collapse of the fetal skull, microcephaly, scalp rugae, and neurologic impairment: the fetal brain disruption sequence. *Am J Med Genet*. 1984 Feb;17(2):509–21.
- 22 Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, Fonseca EB, et al. Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr*. 2017 Mar;171(3):288–95.
- 23 Zin AA, Tsui I, Rossetto J, Vasconcelos Z, Adachi K, Valderramos S, et al. Screening Criteria for Ophthalmic Manifestations of Congenital Zika Virus Infection. *JAMA Pediatr*. 2017 Sep;171(9):847–54.
- 24 Nem de Oliveira Souza I, Frost PS, França JV, Nascimento-Viana JB, Neris RL, Freitas L, et al. Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Sci Transl Med*. 2018 Jun;10(444):eaar2749.
- 25 Adams Waldorf KM, Nelson BR, Stencel-Baerenwald JE, Studholme C, Kapur RP, Armistead B, et al. Congenital Zika virus infection as a silent pathology with loss of neurogenic output in the fetal brain. *Nat Med*. 2018 Mar;24(3):368–74.
- 26 Mavigner M, Raper J, Kovacs-Balint Z, Gumber S, O'Neal JT, Bhaumik SK, et al. Postnatal Zika virus infection is associated with persistent abnormalities in brain structure, function, and behavior in infant macaques. *Sci Transl Med*. 2018 Apr;10(435):eaao6975.
- 27 Challis JR, Lockwood CJ, Myatt L, Norman JE, Strauss JF 3rd, Petraglia F. Inflammation and pregnancy. *Reprod Sci*. 2009 Feb;16(2):206–15.
- 28 Aagaard K, Ma J, Antony KM, Ganu R, Petrosino J, Versalovic J. The placenta harbors a unique microbiome. *Sci Transl Med*. 2014 May;6(237):237ra65.
- 29 Campbell DE, Boyle RJ, Thornton CA, Prescott SL. Mechanisms of allergic disease - environmental and genetic determinants for the development of allergy. *Clin Exp Allergy*. 2015 May;45(5):844–58.
- 30 Mold JE, Michaëlsson J, Burt TD, Muench MO, Beckerman KP, Busch MP, et al. Maternal alloantigens promote the development of tolerogenic fetal regulatory T cells in utero. *Science*. 2008 Dec;322(5907):1562–5.
- 31 Underwood MA, Gilbert WM, Sherman MP. Amniotic fluid: not just fetal urine anymore. *J Perinatol*. 2005 May;25(5):341–8.
- 32 Medawar PB. Some Immunological and Endocrinological problems raised by the evolution of viviparity in vertebrates. *Symp Soc Exp Biol*. 1953;7:320–8.
- 33 McEwan M, Lins RJ, Munro SK, Vincent ZL, Ponnampalam AP, Mitchell MD. Cytokine regulation during the formation of the fetal-maternal interface: focus on cell-cell adhesion and remodelling of the extra-cellular matrix. *Cytokine Growth Factor Rev*. 2009 Jun;20(3):241–9.
- 34 Ashkar AA, Di Santo JP, Croy BA. Interferon gamma contributes to initiation of uterine vascular modification, decidual integrity, and uterine natural killer cell maturation during normal murine pregnancy. *J Exp Med*. 2000 Jul;192(2):259–70.
- 35 Moreau P, Adrian-Cabestre F, Menier C, Guiard V, Gourand L, Dausset J, et al. IL-10 selectively induces HLA-G expression in human trophoblasts and monocytes. *Int Immunol*. 1999 May;11(5):803–11.
- 36 Saito S, Nakashima A, Shima T, Ito M. Th1/Th2/Th17 and regulatory T-cell paradigm in pregnancy. *Am J Reprod Immunol*. 2010 Jun;63(6):601–10.
- 37 Boldenow E, Jones S, Lieberman RW, Chames MC, Aronoff DM, Xi C, et al. Antimicrobial peptide response to group B Streptococcus in human extraplacental membranes in culture. *Placenta*. 2013 Jun;34(6):480–5.
- 38 Spencer J, Dillon SB, Isaacson PG, MacDonald TT. T cell subclasses in fetal human ileum. *Clin Exp Immunol*. 1986 Sep;65(3):553–8.
- 39 Blom B, Res PC, Spits H. T cell precursors in man and mice. *Crit Rev Immunol*. 1998;18(4):371–88.
- 40 Michaëlsson J, Mold JE, McCune JM, Nixon DF. Regulation of T cell responses in the developing human fetus. *J Immunol*. 2006 May;176(10):5741–8.
- 41 Tegethoff M, Greene N, Olsen J, Meyer AH, Meinschmidt G. Maternal psychosocial adversity during pregnancy is associated with length of gestation and offspring size at birth: evidence from a population-based cohort study. *Psychosom Med*. 2010 May;72(4):419–26.
- 42 Labouesse MA, Langhans W, Meyer U. Long-term pathological consequences of prenatal infection: beyond brain disorders. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol*. 2015 Jul;309(1):R1–12.
- 43 Avitsur R, Levy S, Goren N, Grinshpahet R. Early adversity, immunity and infectious disease. *Stress*. 2015;18(3):289–96.
- 44 Fortier ME, Luheshi GN, Boksa P. Effects of prenatal infection on prepulse inhibition in the rat depend on the nature of the infectious agent and the stage of pregnancy. *Behav Brain Res*. 2007 Aug;181(2):270–7.
- 45 Patterson PH. Maternal infection and immune involvement in autism. *Trends Mol Med*. 2011 Jul;17(7):389–94.
- 46 Vohr BR, Poggi Davis E, Wanke CA, Krebs NF. Neurodevelopment: The Impact of Nutrition and Inflammation during Preconception and Pregnancy in Low-Resource Settings. *Pediatrics*. 2017 Apr;139 Suppl 1:S38–49.
- 47 Hutton J. Does Rubella Cause Autism: A 2015 Reappraisal? *Front Hum Neurosci*. 2016 Feb;10:25.
- 48 Slawinski BL, Talge N, Ingersoll B, Smith A, Glazier A, Kerver J, et al. Maternal cytomegalovirus sero-positivity and autism symptoms in children. *Am J Reprod Immunol*. 2018 May;79(5):e12840.
- 49 Maeyama K, Tomioka K, Nagase H, Yoshioka M, Takagi Y, Kato T, et al. Congenital Cytomegalovirus Infection in Children with Autism Spectrum Disorder: Systematic Review and Meta-Analysis. *J Autism Dev Disord*. 2018 May;48(5):1483–91.
- 50 Gottfried C, Bambini-Junior V, Francis F, Riesgo R, Savino W. The Impact of Neuroimmune Alterations in Autism Spectrum Disorder. *Front Psychiatry*. 2015 Sep;6:121.
- 51 Rodríguez-Rojas R. Chapter 6. Neuroimages in autism. In: Robinson-Agramonte MA, editor. *Translational Approaches to Autism Spectrum Disorder*. Cham: Springer; 2015. p. 95–117.
- 52 Wegiel J, Kuchna I, Nowicki K, Imaki H, Wegiel J, Marchi E, et al. The neuropathology of autism: defects of neurogenesis and neuronal migration, and dysplastic changes. *Acta Neuropathol*. 2010 Jun;119(6):755–70.
- 53 Chen R, Jiao Y, Herskovits EH. Structural MRI in autism spectrum disorder. *Pediatr Res*. 2011 May;69(5 Pt 2):63R–8R.
- 54 Park MTM, Raznahan A, Shaw P, Goqday N, Lerch JP, Chakravarty MM. Neuroanatomical phenotypes in mental illness: identifying convergent and divergent cortical phenotypes across autism, ADHD and schizophrenia. *J Psychiatry Neurosci*. 2018 Feb;43(2):170094.
- 55 Doherty GH. Developmental switch in the effects of TNFalpha on ventral midbrain dopaminergic neurons. *Neurosci Res*. 2007 Feb;57(2):296–305.
- 56 Monje ML, Toda H, Palmer TD. Inflammatory blockade restores adult hippocampal neurogenesis. *Science*. 2003 Dec;302(5651):1760–5.
- 57 Morgan JT, Chana G, Pardo CA, Achim C, Semendeferi K, Buckwalter J, et al. Microglial activation and increased microglial density observed in the dorsolateral prefrontal cortex in autism. *Biol Psychiatry*. 2010 Aug;68(4):368–76.

- 58 Ashwood P, Krakowiak P, Hertz-Picciotto I, Hansen R, Pessah I, Van de Water J. Elevated plasma cytokines in autism spectrum disorders provide evidence of immune dysfunction and are associated with impaired behavioral outcome. *Brain Behav Immun*. 2011 Jan; 25(1):40–5.
- 59 Businaro R, Corsi M, Azzara G, Di Raimo T, Laviola G, Romano E, et al. Interleukin-18 modulation in autism spectrum disorders. *J Neuroinflammation*. 2016 Jan;13(1):2.
- 60 Kalkbrenner AE, Daniels JL, Chen JC, Poole C, Emch M, Morrissey J. Perinatal exposure to hazardous air pollutants and autism spectrum disorders at age 8. *Epidemiology*. 2010 Sep;21(5):631–41.
- 61 Li X, Chauhan A, Sheikh AM, Patil S, Chauhan V, Li XM, et al. Elevated immune response in the brain of autistic patients. *J Neuroimmunol*. 2009 Feb;207(1-2):111–6.
- 62 Wei H, Zou H, Sheikh AM, Malik M, Dobkin C, Brown WT, et al. IL-6 is increased in the cerebellum of autistic brain and alters neural cell adhesion, migration and synaptic formation. *J Neuroinflammation*. 2011 May;8(1):52.
- 63 Wei H, Chadman KK, McCloskey DP, Sheikh AM, Malik M, Brown WT, et al. Brain IL-6 elevation causes neuronal circuitry imbalances and mediates autism-like behaviors. *Biochim Biophys Acta*. 2012 Jun;1822(6):831–42.
- 64 Wei H, Ma Y, Liu J, Ding C, Jin G, Wang Y, et al. Inhibition of IL-6 trans-signaling in the brain increases sociability in the BTBR mouse model of autism. *Biochim Biophys Acta*. 2016 Oct;1862(10):1918–25.
- 65 Malkova NV, Yu CZ, Hsiao EY, Moore MJ, Patterson PH. Maternal immune activation yields offspring displaying mouse versions of the three core symptoms of autism. *Brain Behav Immun*. 2012 May;26(4):607–16.
- 66 Smith SE, Li J, Garbett K, Mirnic K, Patterson PH. Maternal immune activation alters fetal brain development through interleukin-6. *J Neurosci*. 2007 Oct;27(40):10695–702.
- 67 Patel AS, Zalcman SS. Interleukin-2 treatment induces an acquired behavioral response pattern (repetitive stereotyped movements) mediated by dopamine D1 and D2 receptors. *Int Neuropsychiatr Dis J*. 2014;2(4):175–85.
- 68 Ahmad SF, Ansari MA, Nadeem A, Bakheet SA, Al-Ayadhi LY, Attia SM. Toll-like receptors, NF- κ B, and IL-27 mediate adenosine A2A receptor signaling in BTBR T(+)/Itpr3(tf)/J mice. *Prog Neuropsychopharmacol Biol Psychiatry*. 2017 Oct;79(Pt B):184–191.
- 69 Ansari MA, Nadeem A, Attia SM, Bakheet SA, Raish M, Ahmad SF. Adenosine A2A receptor modulates neuroimmune function through Th17/retinoid-related orphan receptor gamma t (ROR γ t) signaling in a BTBR T+ Itpr3tf/J mouse model of autism. *Cell Signal*. 2017 Aug;36:14–24.
- 70 Ansari MA, Attia SM, Nadeem A, Bakheet SA, Raish M, Khan TH, et al. Activation of adenosine A2A receptor signaling regulates the expression of cytokines associated with immunologic dysfunction in BTBR T+ Itpr3tf/J mice. *Mol Cell Neurosci*. 2017 Jul;82:76–87.
- 71 Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, et al. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol*. 2015 Sep;89(17):8880–96.
- 72 OLAGNIER D, MUSCOLINI M, COYNE CB, DIAMOND MS, HISCOTT J. Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. *DNA Cell Biol*. 2016 Aug;35(8):367–72.

CAPÍTULO XIII

DISCUSSÃO

DISCUSSÃO

Em 2015, o Brasil e o mundo foram surpreendidos por uma epidemia de casos de microcefalia de causa desconhecida no país (Albuquerque et al., 2018). Os casos de nascidos vivos com este fenótipo se espalharam muito rapidamente no país e em países da América Latina, fazendo com que o evento fosse considerado uma Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN) e Internacional (ESPIL) (Brasil, 2015c; WHO, 2016c).

Na época, investigações epidemiológicas buscaram entender a causa de tantas crianças estarem nascendo com microcefalia e outras anomalias cerebrais e, a partir de diversos estudos, identificaram o ZIKV como o agente etiológico destes fenótipos (Krauer et al., 2017). Investigações com a finalidade de descrever o quadro clínico destas crianças passaram a ser também conduzidas, sendo que tal doença passou a ser denominada Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika (SCZ) (del Campo et al., 2017).

Concomitantemente com estes estudos epidemiológicos e clínicos, estudos experimentais começaram a investigar os mecanismos de entrada do vírus nas células, a resposta imune de combate ao ZIKV e os principais efeitos do vírus a nível celular e molecular que poderiam explicar o desenvolvimento deste fenótipo adverso nas crianças expostas a ele durante a vida intra-útero (Hamel et al., 2015; Faizan et al., 2016; Li et al., 2016; Miner et al., 2016; Nowakowski et al., 2016; Wells et al., 2016). Tais investigações, no entanto, se mostraram ainda mais desafiadoras, pois seus resultados, diferente de estudos epidemiológicos e clínicos, nem sempre eram concordantes e apontavam para um caminho comum. Assim, apesar dos estudos até o momento terem contribuído imensamente para o entendimento da patogênese do ZIKV, investigações adicionais ainda são necessárias para preencher lacunas do conhecimento ou para fortalecer algumas hipóteses e achados.

Levando em conta que o principal agente transmissor do ZIKV, o mosquito *Aedes aegyptii*, ainda é amplamente presente no país (Brasil, 2021b), a infecção pelo

ZIKV é uma realidade que temos que conviver no país e, à medida que o tempo passa, mulheres em idade fértil ainda não infectadas podem entrar em contato com o vírus e, caso estejam grávidas, bebês com SCZ podem nascer. Embora dados oficiais mostrem que o número de casos diminuiu a partir de 2017, eles ainda ocorrem. Em 2020, 886 casos suspeitos de SCZ foram notificados ao Ministério da Saúde sendo que muitos ainda estão sob investigação (Brasil, 2021c). Acredita-se, no entanto, que novos casos vêm sendo subnotificados, uma vez que o período de emergência e de epidemia já passou e a atenção dos profissionais de saúde em relação a esta questão pode ter diminuído. Assim, percebemos que os efeitos do ZIKV na gestação foram, permanecem e ainda podem representar no futuro um importante problema de saúde pública. Desta forma, estudos que busquem o entendimento dos mecanismos envolvidos com a doença podem também fornecer informações que subsidiem o desenvolvimento de medidas como a prevenção dos efeitos adversos do vírus e aconselhamento às gestantes sobre seu risco individual.

Neste contexto, os trabalhos que compõem esta tese de doutorado surgiram de uma necessidade de se melhor compreender os mecanismos envolvidos com os efeitos adversos gerados pela infecção congênita pelo ZIKV, e também devido à escassez de estudos avaliando o papel da genética dos indivíduos expostos ao vírus na ocorrência destes desfechos. Estudos de revisão e meta-análise foram desenvolvidos, a fim de se avaliar e comparar dados previamente publicados, buscando uma melhor compreensão de vias biológicas e genes comumente afetados pelo ZIKV em suas células neurais alvo. Além disso, diferentes estudos genético-moleculares com crianças expostas ao ZIKV foram conduzidos, a fim de se identificar variantes de risco para a ocorrência da SCZ. Para tanto, diferentes abordagens metodológicas foram aplicadas, bem como desenhos de estudos diferentes, incluindo estudos de caso-controle, relato de caso e série de casos. Finalmente, um estudo buscou discutir o papel que o ZIKV pode ter na ocorrência de transtornos neurológicos, como o transtorno do espectro autista, em indivíduos expostos durante a gestação, uma potencial repercussão da exposição intraútero que permanece por ser elucidada.

Avaliação dos mecanismos moleculares de teratogênese do vírus Zika investigados através de revisão da literatura e meta-análise

Considerando as abordagens utilizadas para investigações sobre os mecanismos moleculares envolvidos com a infecção e teratogênese do ZIKV, inicialmente os estudos buscaram avaliar, especialmente células neurais, como o ZIKV afeta a expressão gênica (Rolfe et al., 2016; Tang et al., 2016; Zhang et al., 2016; Ghouzzi et al., 2017) e, menos frequentemente, a expressão proteica e perfil de metilação gênica (Lichinchi et al., 2016; Garcez et al., 2017). No entanto, como estes estudos utilizavam diferentes linhagens do ZIKV – asiática ou africana – e avaliavam a expressão diferencial em distintos momentos após a exposição, se percebeu uma heterogeneidade na descrição de genes e vias biológicas afetadas pelo ZIKV. De forma relativamente comum, mesmo considerando esta variabilidade metodológica citada, os estudos *in vitro* compartilhavam um achado comum: a identificação do efeito da infecção pelo ZIKV na desregulação de genes envolvidos na resposta imune e antiviral. Em diferentes tipos celulares estes genes apareciam, geralmente, com expressão aumentada como um mecanismo das células para combater a infecção.

Uma alternativa para melhor comparar os dados gerados agregando os resultados de tais estudos seria por meio de uma meta-análise de transcriptoma (Waldron et al., 2016). Desta forma, no capítulo V nós conduzimos uma meta-análise a partir de diferentes estudos *in vitro* que realizaram RNA-seq para avaliar a expressão gênica diferencial de células neurais expostas ao ZIKV. Nossos achados corroboraram o que vinha sendo apresentado sobre o impacto de ZIKV no aumento da expressão de genes envolvidos na resposta antiviral, apontando quais são os principais genes desta via que costumam ser afetados (Hamel et al., 2017). Ao mesmo tempo, observamos um resultado menos discutido na literatura: a regulação negativa da expressão de genes que, quando mutados, são causadores de fenótipos observados na SCZ, como a microcefalia (Li et al., 2016). A microcefalia de causa genética envolve a ocorrência de variantes patogênicas em homozigose em genes diversos genes,

sendo que o fenótipo se dá por uma insuficiência de seu produto (Faheem et al., 2015; Naveed et al., 2018). A partir do nosso estudo de meta-análise, reforçamos o papel que o ZIKV pode ter “simulando” o que ocorre nestas doenças de causas genéticas, uma vez que ele também diminui a expressão do produto destes genes e, conseqüentemente, leva a um fenótipo similar àquele causado por causas genéticas.

Também buscando o entendimento dos mecanismos moleculares de teratogênese do ZIKV, estudos *in vivo* começaram a ser conduzidos ainda em 2015 (Xu et al., 2019b). Modelos animais representam uma excelente alternativa para a investigação da infecção pelo ZIKV, uma vez que eles se aproximam mais fielmente do cenário em humanos, no qual vários tipos de células são expostos e afetados pelo vírus ao mesmo tempo. A fim de avaliar, comparar e discutir os resultados apresentados por tais estudos, nós conduzimos uma revisão sistemática da literatura. Identificamos que embora muito importante, a avaliação dos efeitos moleculares do ZIKV em modelos animais é bem menos frequente, em comparação com os estudos *in vitro*. Além disso, eles se mostram ainda mais heterogêneos, pois além das questões já mencionadas sobre o uso de diferentes linhagens do ZIKV e o tempo de exposição, eles utilizam diferentes espécies e linhagens de cada espécie. Em comum com os estudos *in vitro*, os modelos animais também demonstram que o efeito do ZIKV se dá com maior impacto em genes envolvidos na resposta antiviral e apoptose, os quais tem um importante aumento de sua expressão (Li et al., 2016; Shao et al., 2016; Darbellay et al., 2017; Vermillion et al., 2017; Yockey et al., 2018; Khaiboullina et al., 2019; Barbeito-Andrés et al., 2020). Além disso, alguns estudos demonstram que o ZIKV diminui a expressão de genes que atuam no neurodesenvolvimento e divisão celular, mas isso se dá de forma muito mais sutil e geralmente os genes envolvidos nestes processos são demonstrados como afetados em um estudo não são os mesmos demonstrados em outro (Li et al., 2016; Darbellay et al., 2017; Thawani et al., 2018; Rathore et al., 2019; Barbeito-Andrés et al., 2020).

Investigação da susceptibilidade genética para a teratogênese do ZIKV

Um importante aspecto na ocorrência de anomalias congênitas devido a exposição ao ZIKV, ainda pouco explorado desde o reconhecimento desta condição, são os aspectos genéticos da mãe e da criança e seu papel na ocorrência das anomalias. Uma exposição a um teratígeno, seja ele um agente químico, físico ou biológico nem sempre é capaz de causar anomalias congênitas em um embrião ou feto exposto. O papel na genética na ocorrência dos efeitos adversos associados à exposição de um teratígeno é muito importante e, por isso, a suscetibilidade genética é considerada um dos princípios da teratogênese (Wilson and Fraser, 1977).

Para avaliar esse aspecto, no contexto do ZIKV, o desenho ideal envolve a avaliação de indivíduos expostos ao ZIKV na gestação, sejam eles mães ou seus filhos, e a comparação entre aqueles que desenvolveram com os que não desenvolveram os desfechos desfavoráveis. Neste sentido, considerando a genética como um dos aspectos que pode explicar a ocorrência da SCZ em apenas parte dos indivíduos expostos e dada a lacuna de conhecimento em relação a isso, este trabalho teve como um dos principais objetivos abordar essa questão. Para tanto, estudos de caso controle, envolvendo indivíduos expostos ao ZIKV que desenvolveram ou não a SCZ, foram conduzidos. Dado o desafio para composição deste tipo de amostra, foi fundamental a colaboração de grupos de pesquisa ao redor do país, tornando possível o desenvolvimento de estudos mais robustos na área, bem como identificação de fatores de risco ou proteção de mais confiabilidade. Além disso, incluímos nesta tese de doutorado a investigação de gêmeos discordantes para a SCZ, sendo esta mais uma estratégia para a investigação do papel da genética nesta doença, uma vez que este tipo de estudo é muito utilizado para o entendimento do papel da genética em condições complexas (MacGregor et al., 2000; Kaprio et al., 2002). Finalmente, uma investigação de casos de microcefalia associada à infecção pelo ZIKV e casos de microcefalia sem etiologia confirmada foi realizada, a fim de se comparar semelhanças e diferenças entre estes indivíduos em relação ao fenótipo, bem como em relação aos fatores de risco ambientais e genéticos que levaram ao desenvolvimento deste fenótipo nestes indivíduos.

Nossas investigações envolvendo casos e controles focaram em alvos pré-definidos, envolvendo genes que codificam proteínas importantes para o reconhecimento do ZIKV pelas células, ou que atuam na resposta imune e inflamatória que combate a infecção pelo ZIKV, ou que regulam o processo de divisão celular, ou com papel no neurodesenvolvimento. A seleção dos candidatos envolveu alvos que vinham sendo mais apontados na literatura em relação ao impacto do ZIKV na alteração da expressão de genes destas vias (Bayless et al., 2016; Ghouzzi et al., 2016; de Sousa et al., 2018; Dang et al., 2019; Santos et al., 2019). As hipóteses por traz destes estudos eram, de modo geral, comuns e envolveram as seguintes questões: “Variantes genéticas que atuam, mesmo que de forma sutil, na regulação da expressão de seus genes ou função de suas proteínas podem atuar, juntamente como o ZIKV, afetando a disponibilidade e eficiência das proteínas?” e “Como uma disponibilidade e eficiência maior ou menor do que a normal de proteínas que atuam na resposta imune, ciclo celular e neurodesenvolvimento pode influenciar na ocorrência da SCZ?”. Considerando os achados dos estudos que foram conduzidos, foi verificado que variantes genéticas em genes destas vias, como *NOS2* e o *miR-124* podem contribuir para um risco aumentado de desenvolvimento da SCZ. Além disso, variantes em *TP53* e *TNF* podem representar fatores de risco para fenótipos específicos que compõe essa doença. No entanto, destacamos que, assim como os demais estudos publicados, nossos achados devem levar em consideração o tamanho da amostra que avaliamos ($n = 88$ indivíduos), bem como a heterogeneidade da amostra em relação a proveniência dos indivíduos e momento de exposição ao ZIKV.

A investigação conduzida nos gêmeos discordantes, por outro lado, demonstrou que tanto variantes raras quanto comuns podem ter contribuído para o desenvolvimento da SCZ. Neste caso, variantes em genes que atuam no neurodesenvolvimento, em outros processos do desenvolvimento e na organização da célula parecem ter tido um papel nessa suscetibilidade. Considerando que apenas um estudo comparando gêmeos foi publicado até o momento, não tendo descritos variantes de risco nos indivíduos afetados (Caires-Júnior et al., 2018), os achados

deste trabalho representam uma importante contribuição para a temática destacando o possível papel que a desregulação destes processos biológicos pode ter na ocorrência da SCZ.

Considerando a investigação de casos com microcefalia de etiologia desconhecida, o racional para a realização do estudo foi diferente. A microcefalia foi a anomalia congênita que permitiu a identificação da epidemia em 2015 (Albuquerque et al., 2018). Este fenótipo é considerado sentinela e utilizado como alerta para a investigação de possíveis casos de SCZ desde 2015 (Albuquerque et al., 2018; Brasil, 2015d; Brasil, 2017b). Considerando que cerca de 80% dos casos de infecção pelo ZIKV são assintomáticos, muitas mães que não apresentaram sintomas dão à luz a crianças com microcefalia que, conseqüentemente, requerem uma investigação sobre o possível papel do ZIKV neste fenótipo (Duffy et al., 2019; Brasil, 2017b). No entanto, é importante destacar que do ponto de vista epidemiológico, muitos casos de microcefalia oriundos de outras infecções congênitas ou de causas genéticas são também esperados e tais fatores devem ser levados em consideração na investigação clínica destes indivíduos. Com base nisso, a investigação que realizamos buscou descrever achados genéticos de crianças com a SCZ e compará-los com casos de microcefalia de causa desconhecida se, na ausência de evidência de exposição a STORCH-Z na gestação, e buscar por variantes que poderiam sugerir que fossem casos de SCZ ou devido a síndromes genéticas. Os achados deste estudo demonstraram que os casos de SCZ compartilhavam alterações em genes de semelhante impacto, ou seja, genes que quando mutados levam a ocorrência de microcefalia. Já entre os casos com microcefalia de causa desconhecida, um deles parece de fato apresentar esse fenótipo em função de mutações em *ASPM*, um clássico gene causador da microcefalia primária autossômica recessiva (Faheem et al., 2015). Os demais casos apresentaram resultados heterogêneos, que não os classificam como tendo fenótipo por causas genéticas e, portanto, continuaram sem o reconhecimento do fator etiológico para o fenótipo. É importante destacar que outros casos de embriopatias, inicialmente pensadas como causadas por agentes

teratógenos, já foram identificadas como causadas por agentes genéticos, sendo este evento algo que não é incomum na literatura (Cassina et al., 2017).

Especulação sobre o efeito da infecção pelo ZIKV durante a gestação e o desenvolvimento de Transtorno do Espectro Autista (TEA) em crianças expostas

Segundo o Ministério da Saúde, até o final de 2020, 3.577 crianças foram confirmadas para a SCZ ou outras etiologias infecciosas no país, sendo que muitos casos suspeitos de SCZ ainda permanecem sob investigação (Brasil, 2021c). Grande parte destas crianças tem 5 ou 6 anos de idade. Neste sentido, nos últimos anos, estudos têm buscado avaliar o neurodesenvolvimento e a evolução clínica destas crianças expostas ao ZIKV na gestação (Saad et al., 2018; Nielsen-Saines et al., 2019; Abtibol-Bernardino et al., 2020; Aizawa et al., 2021). No entanto, os efeitos a longo prazo do ZIKV nestes indivíduos ainda são pouco conhecidos e descritos. Dada as repercussões neurológicas do vírus, profissionais da assistência e pesquisadores começaram a se perguntar sobre o efeito do ZIKV no desenvolvimento de transtornos neuropsiquiátricos, como por exemplo o transtorno do espectro autista. Considerando o que se sabe sobre as causas desta condição, o perfil de resposta imune da mãe frente a uma infecção como a do ZIKV, e o tropismo viral, esta suspeita apresenta um sentido biológico. Portanto, neste trabalho, nós elaboramos e apresentamos uma hipótese de como este evento poderia ocorrer, do ponto de vista biológico (Vianna et al., 2018). Posteriormente, alguns estudos relataram a ocorrência de autismo em crianças expostas ao ZIKV na gestação (Nielsen-Saines et al., 2019; Abtibol-Bernardino et al., 2020). No entanto, dado o caráter descritivo destes estudos, não foi possível identificar ainda se o ZIKV aumenta a frequência deste agravo nestes indivíduos. Portanto, é necessário que novos estudos, mais robustos, sejam conduzidos com crianças expostas a esse vírus na gestação para que se identifique se, de fato, o transtorno do espectro autista (TEA), o transtorno do déficit de atenção com hiperatividade (TDAH) ou outros transtornos estão ocorrendo em uma frequência elevada nestes indivíduos.

CAPÍTULO XIV

CONCLUSÕES

CONCLUSÕES

Este trabalho atendeu seu objetivo principal, quanto a avaliação de mecanismos moleculares associados com a teratogenicidade do vírus Zika, através de diferentes tipos de estudo, conforme segue:

Avaliação dos mecanismos moleculares de teratogênese do vírus Zika investigados através de revisão da literatura e meta-análise;

A partir dos 9 estudos incluídos na revisão sistemática, identificamos e discutimos que, em modelos animais, genes regulados positivamente foram geralmente relacionados às vias de resposta imune, enquanto aqueles envolvidos no neurodesenvolvimento foram regulados negativamente após a infecção pelo ZIKV.

Na meta-análise, a partir da avaliação de estudos *in vitro* com células neurais, foram identificados 125 genes regulados positivamente em células neurais, principalmente genes estimulados por interferon, envolvidos na resposta antiviral. Além disso, 167 regulados negativamente foram observados, os quais são envolvidos com a organização das células para a divisão celular. Entre esses genes regulados negativamente, discutimos a presença de genes clássicos causadores de microcefalia, demonstrando um possível mecanismo pelo qual o ZIKV induz o desenvolvimento desse fenótipo em indivíduos com CZS.

Investigação da susceptibilidade genética para a teratogênese do ZIKV;

Não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa entre os polimorfismos avaliados em *AXL*, *TLR3* e *STAT2* e uma maior suscetibilidade para a ocorrência de SCZ. No entanto, através de uma avaliação de biologia de sistemas, as proteínas EGFR e SCR, que interagem com *AXL*, *TLR3* e *STAT2*, foram identificadas como importantes e candidatas promissoras para estudos futuros no contexto da teratogênese do ZIKV.

Também não encontramos nenhuma associação estatisticamente significativa entre polimorfismos em genes da via de sinalização de p53 e a ocorrência de SCZ.

Contudo, avaliando fenótipos específicos que compõem a SCZ, foi identificada uma diferença estatisticamente significativa nas frequências alélicas do polimorfismo rs1042522 de *TP53* entre indivíduos com e sem lissencefalia ($p = 0,007$).

Identificamos que um polimorfismo no *MIR-124-1* parece estar associado com a SCZ e sugerimos que essa variante poderia atuar de forma conjunta com o ZIKV na diminuição da expressão de genes de neurodesenvolvimento, favorecendo à ocorrência da SCZ.

Através do sequenciamento completo do exoma de um par de gêmeos discordantes para a SCZ, destacamos – no gêmeo com a doença – deleções em genes atuam nos processos de desenvolvimento e organização celular. Sugerimos que tais variantes podem ter contribuído para o desenvolvimento do SCZ nesse gêmeo, uma vez que, juntamente com o efeito do ZIKV, tornariam os processos biológicos citados menos eficientes.

Através do sequenciamento completo do exoma de crianças com SCZ e crianças com microcefalia por causa desconhecida, percebeu-se que tanto variantes comuns quanto raras, combinadas, parecem ter contribuído para a suscetibilidade dos indivíduos com SCZ. Os genes em que essas variantes estavam presentes foram principalmente aqueles que, quando mutados, levam a fenótipos semelhantes aos do SCZ.

Especulação sobre o efeito da infecção pelo ZIKV durante a gestação e o desenvolvimento de Transtorno do Espectro Autista (TEA) em crianças expostas;

Através da revisão de uma série de estudos que avaliam aspectos relacionados ao desenvolvimento do cérebro, estado imunológico durante a gravidez e neuroimunomodulação em infecções virais congênitas, foi discutido o papel que a infecção cerebral fetal causada pelo ZIKV poderia ter na predisposição ao Transtorno do Espectro Autista (TEA). Finalmente, sugerimos um possível mecanismo, incluindo

vias neurológicas e imunológicas, que poderia levar ao desenvolvimento de TEA em crianças após a infecção pelo ZIKV na gestação.

CAPÍTULO XVI

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Abtibol-Bernardino MR, de Almeida Peixoto LFA, de Oliveira GA, de Almeida TF, Rodrigues GRI, Otani RH, Soares Chaves BC, de Souza Rodrigues C, de Andrade ABCA, de Fatima Redivo E, et al (2020) Neurological Findings in Children without Congenital Microcephaly Exposed to Zika Virus in Utero: A Case Series Study. *Viruses*. 12(11):1335.
2. Abuelo D (2007) Microcephaly syndromes. *Semin Pediatr Neurol* 14:118–127.
3. Adams Waldorf KM and McAdams RM (2013) Influence of infection during pregnancy on fetal development. *Reproduction* 146:R151-R162.
4. Agrelli A, de Moura RR, Crovella S and Brandão LAC (2019) ZIKA virus entry mechanisms in human cells. *Infect Genet Evol* 69:22-29.
5. Aguiar RS, Pohl F, Morais GL, Nogueira FCS, Carvalho JB, Guida L, Arge LWP, Melo A, Moreira MEL, Cunha DP, et al (2020) Molecular alterations in the extracellular matrix in the brains of newborns with congenital Zika syndrome. *Sci Signal* 13:eaay6736.
6. Ahmad F, Siddiqui A, Kamal MA and Sohrab SS (2018) Inhibition of Neurogenesis by Zika Virus Infection. *CNS Neurol Disord Drug Targets* 17:78-86.
7. Aizawa CYP, Caron DMR, Souza CB, Kozima PFA, Damasceno L, Einspieler C, Marschik PB, Brasil P, Schmitt ACB, Nielsen-Saines K, Hasue RH. Neurodevelopment in the third year of life in children with antenatal ZIKV-exposure (2021) *Rev Saude Publica*. 55:15.
8. Albuquerque MFPM, Souza WV, Araújo TVB, Braga MC, Miranda-Filho DB, Ximenes RAA, Filho DAM, Brito CAA, Valongueiro S, Melo APL, et al (2018) Epidemia de microcefalia e vírus Zika: a construção do conhecimento em epidemiologia. *Cad. Saúde Pública*. 34:e00069018.
9. Amaral MS, Goulart E, Caires-Júnior LC, Morales-Vicente DA, Soares-Schanoski A, Gomes RP, Olberg GGO, Astray RM, Kalil JE, Zet al (2020) Differential gene expression elicited by ZIKV infection in trophoblasts from congenital Zika syndrome discordant twins. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008424.
10. Anders S, Pyl PT and Huber W (2015) HTSeq--a Python framework to work with high-throughput sequencing data. *Bioinformatics* 31:166-169.
11. Anderson D, Neri JICF, Souza CRM, Valverde JG, De Araújo JMG, Nascimento MDSB, Branco RCC, Arrais NMR, Lassmann T, Blackwell JM and Jeronimo SMB (2020) Zika virus changes methylation of genes involved in immune response and neural development in Brazilian babies born with congenital microcephaly. *J Infect Dis* 223:435-440.
12. Azouz F, Arora K, Krause K, Nerurkar VR and Kumar M (2019) Integrated MicroRNA and mRNA Profiling in Zika Virus-Infected Neurons. *Viruses* 11:162.
13. Bao R, Huang L, Andrade J, Tan W, Kibbe WA, Jiang H and Feng G (2014) Review of current methods, applications, and data management for the bioinformatics analysis of whole exome sequencing. *Cancer Inform* 13:67-82.
14. Barba-Spaeth G, Dejnirattisai W, Rouvinski A, Vaney MC, Medits I, Sharma A, Simon-Lorière E, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau VM, Haouz A, et al (2016)

- Structural basis of potent Zika-dengue virus antibody cross-neutralization. *Nature* 536:48-53. Erratum in: *Nature* 539:314.
15. Barbeito-Andrés J, Pezzuto P, Higa LM, Dias AA, Vasconcelos JM, Santos TMP, Ferreira JCCG, Ferreira RO, Dutra FF, Rossi AD, et al (2020) Congenital Zika syndrome is associated with maternal protein malnutrition. *Sci Adv* 6:eaaw6284.
 16. Barjas-Castro ML, Angerami RN, Cunha MS, Suzuki A, Nogueira JS, Rocco IM, Maeda AY, Vasami FG, Katz G, Boin IF, et al (2016) Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. *Transfusion* 56:1684-1688.
 17. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Marshall KA, et al (2009) NCBI GEO: archive for high-throughput functional genomic data. *Nucleic Acids Res* 37:D885-90.
 18. Barrett T, Troup DB, Wilhite SE, Ledoux P, Rudnev D, Evangelista C, Kim IF, Soboleva A, Tomashevsky M, Edgar R (2007) NCBI GEO: mining tens of millions of expression profiles--database and tools update. *Nucleic Acids Res* 35:D760-5.
 19. Bayless NL, Greenberg RS, Swigut T, Wysocka J, Blish CA (2016) Zika Virus Infection Induces Cranial Neural Crest Cells to Produce Cytokines at Levels Detrimental for Neurogenesis. *Cell Host Microbe*. 20:423–428.
 20. Bertolli J, Attell JE, Rose C, Moore CA, Melo F, Staples JE, Kotzky K, Krishna N, Satterfield-Nash A, Pereira IO, et al (2020) Functional Outcomes among a Cohort of Children in Northeastern Brazil Meeting Criteria for Follow-Up of Congenital Zika Virus Infection. *Am J Trop Med Hyg* 102:955-963.
 21. Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V and Musso D (2014) Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 19:20751.
 22. Blackmon K, Waechter R, Landon B, Noël T, Macpherson C, Donald T, Cudjoe N, Evans R, Burgen KS, et al (2020) Epilepsy surveillance in normocephalic children with and without prenatal Zika virus exposure. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008874.
 23. Brasil P, Pereira JP Jr, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, Valderramos SG, Halai UA, et al (2016) Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *N Engl J Med* 375:2321-2334.
 24. Brasil (2015a) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 46 N° 26. ISSN 2358-9450. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2015/agosto/26/2015-020-publica---o.pdf>
 25. Brasil (2015b) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 46 N° 36. ISSN 2358-9450. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2015/novembro/26/2015-dengue-SE45.pdf>
 26. Brasil (2015c) Ministério da Saúde - Portaria nº1.813, de 11 de novembro de 2015. Disponível em: http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2015/prt1813_11_11_2015.html
 27. Brasil (2015d) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de

- vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia e/ou alterações do sistema nervoso central (SNC). Brasília: Ministério da Saúde, 2015.
28. Brasil (2016) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 47 N° 3. ISSN 2358-9450. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2016/janeiro/15/svs2016-be003-dengue-se52.pdf>
 29. Brasil (2017) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 48 N° 3. ISSN 2358-9450. Disponível em: https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2017/fevereiro/05/2017_002-Dengue%20SE52_corrigido.pdf
 30. Brasil (2017b) Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional: procedimentos para o monitoramento das alterações no crescimento e desenvolvimento a partir da gestação até a primeira infância, relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas dentro da capacidade operacional do SUS. Brasília: Ministério da Saúde, 2017.
 31. Brasil (2018) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 49 N° 2. ISSN 2358-9450. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2018/janeiro/23/Boletim-2018-001-Dengue.pdf>
 32. Brasil (2019) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 50 N° 4. ISSN 9352-7864. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>
 33. Brasil (2020a) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 51 N° 2. ISSN 9352-7864. Disponível em: <https://antigo.saude.gov.br/images/pdf/2020/janeiro/20/Boletim-epidemiologico-SVS-02-1-.pdf>
 34. Brasil (2021) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 52 N° 3. ISSN 9352-7864. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/fevereiro/01/boletim_epidemiologico_svs_3.pdf
 35. Brasil (2021b) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 52 N° 19. ISSN 9352-7864. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/media/pdf/2021/maio/27/boletim_epidemiologico_svs_19.pdf
 36. Brasil (2021c) Boletim Epidemiológico Secretaria de Vigilância em Saúde – Ministério da Saúde Volume - 52 N° 4. ISSN 9352-7864. Disponível em: <http://plataforma.saude.gov.br/anomalias-congenitas/boletim-epidemiologico-SVS-04-2021.pdf>
 37. Brault JB, Khou C, Basset J, Coquand L, Fraisier V, Frenkiel MP, Goud B, Manuguerra JC, Pardigon N and Baffet AD (2016) Comparative Analysis Between Flaviviruses Reveals Specific Neural Stem Cell Tropism for Zika Virus in the Mouse Developing Neocortex. EBioMedicine 10:71-76.

38. Caires-Júnior LC, Goulart E, Melo US, Araujo BHS, Alvizi L, Soares-Schanoski A, de Oliveira DF, Kobayashi GS, Griesi-Oliveira K, Musso CM, et al (2018) Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat Commun* 9:475. Erratum in: *Nat Commun* 9:1114.
39. Calvet G, Aguiar RS, Melo ASO, Sampaio SA, de Filippis I, Fabri A, Araujo ESM, de Sequeira PC, de Mendonça MCL, de Oliveira L, et al (2016) Detection and sequencing of Zika virus from amniotic fluid of fetuses with microcephaly in Brazil: a case study. *Lancet Infect Dis* 16:653-660.
40. Campos GS, Bandeira AC and Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 21:1885-1886.
41. Cao-Lormeau VM, Blake A, Mons S, Lastère S, Roche C, Vanhomwegen J, Dub T, Baudouin L, Teissier A, Larre P, et al (2016) Guillain-Barré Syndrome outbreak associated with Zika virus infection in French Polynesia: a case-control study. *Lancet* 387:1531-1539.
42. Cao-Lormeau VM, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry AL, Mallet HP, Sall AA and Musso D (2014) Zika virus, French polynesia, South pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20:1085-6.
43. Carlson BM (2014). *Embriologia Humana e Biologia do Desenvolvimento*. 5ª edition. Elsevier, Rio de Janeiro, 520 pp.
44. Carteaux G, Maquart M, Bedet A, Contou D, Brugières P, Fourati S, Cleret de Langavant L, de Broucker T, et al (2016) Zika Virus Associated with Meningoencephalitis. *N Engl J Med* 374:1595-1596.
45. Cassina M, Salviati L, Di Gianantonio E and Clementi M (2012) Genetic susceptibility to teratogens: state of the art. *Reprod Toxicol* 34:186-191.
46. Cassina M, Cagnoli GA, Zuccarello D, Di Gianantonio E, Clementi M. Human teratogens and genetic phenocopies (2017) Understanding pathogenesis through human genes mutation. *Eur J Med Genet*. 60:22-31.
47. Castro FL, Geddes VEV, Monteiro FLL, Gonçalves RMDT, Campanati L, Pezzuto P, Paquin-Proulx D, Schamber-Reis BL, Azevedo GS, Gonçalves AL, et al (2019) MicroRNAs 145 and 148a Are Upregulated During Congenital Zika Virus Infection. *ASN Neuro* 11:1759091419850983.
48. Cavalheiro S, Lopez A, Serra S, Da Cunha A, Da Costa MDS, Moron A and Lederman HM (2016) Microcephaly and Zika virus: neonatal neuroradiological aspects. *Childs Nerv Syst* 32:1057-1060.
49. CDC. 2017. Zika Virus - Protecting Pregnant Women and Babies. Disponível em: <https://www.cdc.gov/vitalsigns/zika-babies/infographic.html>
50. Chen J, Yang YF, Yang Y, Zou P, Chen J, He Y, Shui SL, Cui YR, Bai R, Liang YJ, et al (2018) AXL promotes Zika virus infection in astrocytes by antagonizing type I interferon signalling. *Nat Microbiol* 3:302-309.
51. Chiodo F, Verucchi G, Mori F, Attard L and Ricchi E (1993) Infective diseases during pregnancy and their teratogenic effects. *Ann Ist Super Sanita* 29:57-67.
52. Christian KM, Song H and Ming GL (2019) Pathophysiology and Mechanisms of Zika Virus Infection in the Nervous System. *Annu Rev Neurosci* 42:249-269.

53. Cranston JS, Tiene SF, Nielsen-Saines K, Vasconcelos Z, Pone MV, Pone S, Zin A, Salles TS, Pereira JP, Orofino D, et al (2020) Association Between Antenatal Exposure to Zika Virus and Anatomical and Neurodevelopmental Abnormalities in Children. *JAMA Netw Open* 3:e209303.
54. Cugola F, Fernandes I, Russo F, Freitas BC, Dias JLM, Guimarães KP, Benazzato C, Almeida N, Pignatari GC, et al (2016) The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. *Nature* 534:267–271.
55. da Silva MHM, Moises RNC, Alves BEB, Pereira HWB, de Paiva AAP, Morais IC, Nascimento YM, Monteiro JD, de Souto JT, Nascimento MSL, et al (2019) Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. *Med Microbiol Immunol* 208:703-714.
56. Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM and Rana TM (2016) Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell Stem Cell* 19:258-265.
57. Dang JW, Tiwari SK, Qin Y and Rana TM (2019) Genome-wide Integrative Analysis of Zika-Virus-Infected Neuronal Stem Cells Reveals Roles for MicroRNAs in Cell Cycle and Stemness. *Cell Rep* 27:3618-3628.e5
58. Dar HA, Zaheer T, Paracha RZ and Ali A (2017) Structural analysis and insight into Zika virus NS5 mediated interferon inhibition. *Infect Genet Evol* 51:143-152.
59. Darbellay J, Lai K, Babiuk S, Berhane Y, Ambagala A, Wheler C, Wilson D, Walker S, Potter A, Gilmour M, Safronetz D, Gerds V, Karniychuk U (2017) Neonatal pigs are susceptible to experimental Zika virus infection. *Emerg Microbes Infect.* 6(2):e6.
60. de Fatima Vasco Aragao M, van der Linden V, Brainer-Lima AM, Coeli RR, Rocha MA, Sobral da Silva P, Durce Costa Gomes de Carvalho M, van der Linden A, Cesario de Holanda A and Valenca MM (2016) Clinical features and neuroimaging (CT and MRI) findings in presumed Zika virus related congenital infection and microcephaly: retrospective case series study. *BMJ* 353:i1901.
61. de Fatima Viana Vasco Aragão M, van der Linden V, Petribu NC, Valenca MM, Parizel PM and de Mello RJV (2019) Congenital Zika Syndrome: The Main Cause of Death and Correspondence Between Brain CT and Postmortem Histological Section Findings From the Same Individuals. *Top Magn Reson Imaging* 28:29-33.
62. De Góes Cavalcanti LP, Tauil PL, Alencar CH, Oliveira W, Teixeira MM and Heukelbach J (2016) Zika virus infection, associated microcephaly, and low yellow fever vaccination coverage in Brazil: is there any causal link? *J Infect Dev Ctries* 10:563-566.
63. de Paula Freitas B, de Oliveira Dias JR, Prazeres J, Sacramento GA, Ko AI, Maia M and Belfort R Jr (2016) Ocular Findings in Infants With Microcephaly Associated With Presumed Zika Virus Congenital Infection in Salvador, Brazil. *JAMA Ophthalmol* 134:529-535.
64. de Sousa JR, Azevedo RDS, Martins Filho AJ, de Araujo MTF, Cruz EDRM, Vasconcelos BCB, Cruz ACR, de Oliveira CS, Martins LC, et al (2018) In situ

- inflammasome activation results in severe damage to the central nervous system in fatal Zika virus microcephaly cases. *Cytokine*. 111:255-264.
65. Del Campo M, Feitosa IM, Ribeiro EM, Horovitz DD, Pessoa AL, França GV, García-Alix A, Doriqui MJ, Wanderley HY, Sanseverino MV, et al (2017) The phenotypic spectrum of congenital Zika syndrome. *Am J Med Genet A* 173:841-857.
 66. Devhare P, Meyer K, Steele R, Ray RB and Ray R (2017) Zika virus infection dysregulates human neural stem cell growth and inhibits differentiation into neuroprogenitor cells. *Cell Death Dis* 8:e3106.
 67. Dick GW, Kitchen SF and Haddock AJ (1952) Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 46:509-520.
 68. Dolk H, Loane M and Garne E (2010) The prevalence of congenital anomalies in Europe. *Adv Exp Med Biol* 686:349-364.
 69. Dolk H; EUROCAT Project Management Committee (2009) What is the "primary" prevention of congenital anomalies? *Lancet* 374:378.
 70. D'Ortenzio E, Matheron S, Yazdanpanah Y, de Lamballerie X, Hubert B, Piorkowski G, Maquart M, Descamps D, Damond F and Leparac-Goffart I (2016) Evidence of Sexual Transmission of Zika Virus. *N Engl J Med* 374:2195-2198.
 71. Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, et al (2009) Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 360:2536-2543.
 72. Einspieler C, Utsch F, Brasil P, Panvequio Aizawa CY, Peyton C, Hydee Hasue R, Françoso Genovesi F, Damasceno L, Moreira ME, et al (2019) Association of Infants Exposed to Prenatal Zika Virus Infection With Their Clinical, Neurologic, and Developmental Status Evaluated via the General Movement Assessment Tool. *JAMA Netw Open* 2:e187235.
 73. Faheem M, Naseer MI, Rasool M, Chaudhary AG, Kumosani TA, Ilyas AM, Pushparaj P, Ahmed F, Algahtani HA, Al-Qahtani MH, Saleh Jamal H (2015) Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview. *BMC Med Genomics*. 8:S4.
 74. Faizan MI, Abdullah M, Ali S, Naqvi IH, Ahmed A and Parveen S (2016) Zika Virus-Induced Microcephaly and Its Possible Molecular Mechanism. *Intervirology* 59:152-158.
 75. Faye O, Freire CC, Iamarino A, Faye O, De Oliveira JVC, Diallo M, Zanutto PMA and Sall AA (2014) Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20(th) century. *PLoS Negl Trop Dis* 8:e2636.
 76. Finnell RH, Waes JG, Eudy JD and Rosenquist TH (2002) Molecular basis of environmentally induced birth defects. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* 42:181-208.
 77. França GV, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CM, Carmo EH, Pedi VD, Nunes ML, Castro MC, Serruya S, Silveira MF, et al (2016) Congenital Zika virus syndrome in Brazil: a case series of the first 1501 livebirths with complete investigation. *Lancet* 388:891-897.
 78. Fréour T, Mirallié S, Hubert B, Splingart C, Barrière P, Maquart M and Leparac-Goffart I (2016) Sexual transmission of Zika virus in an entirely asymptomatic

- couple returning from a Zika epidemic area, France, April 2016. *Euro Surveill* 21.
79. Friedman JM (2010) The principles of teratology: are they still true? *Birth Defects Res A Clin Mol Teratol* 88:766-768.
 80. Gabriel E, Ramani A, Karow U, Gottardo M, Natarajan K, Gooi LM, Goranci-Buzhala G, Krut O, Peters F, Nikolic M, Kuivanen S, et al (2017) Recent Zika virus isolates induce premature differentiation of neural progenitors in human brain organoids. *Cell Stem Cell* 20:397–406.e5
Garcez PP, Nascimento JM, de Vasconcelos JM, Madeiro da Costa R, Delvecchio R, Trindade P, Loiola EC, Higa LM, Cassoli JS, Vitória G, et al (2017) Zika virus disrupts molecular fingerprinting of human neurospheres. *Sci Rep* 7:40780.
 81. Ghouzzi VE, Bianchi FT, Molineris I, Mounce BC, Berto GE, Rak M, Lebon S, Aubry L, Tocco C, Gai M, et al (2016) ZIKA virus elicits P53 activation and genotoxic stress in human neural progenitors similar to mutations involved in severe forms of genetic microcephaly. *Cell Death Dis* 7:e2440. Erratum in: *Cell Death Dis* 9:1155.
 82. Goodfellow FT, Tesla B, Simchick G, Zhao Q, Hodge T, Brindley MA and Stice SL (2016) Zika Virus Induced Mortality and Microcephaly in Chicken Embryos. *Stem Cells Dev* 25:1691-1697.
 83. Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, Schwarz MC, Sánchez-Seco MP, Evans MJ, Best SM and García-Sastre A (2016) Zika Virus Targets Human STAT2 to Inhibit Type I Interferon Signaling. *Cell Host Microbe* 19:882–890.
 84. Gratton R, Tricarico PM, Agrelli A, Colaço da Silva HV, Coêlho Bernardo L, Crovella S, Campos Coelho AV, Rodrigues de Moura R and Cavalcanti Brandão LA (2020) In Vitro Zika Virus Infection of Human Neural Progenitor Cells: Meta-Analysis of RNA-Seq Assays. *Microorganisms* 8:270.
 85. Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB and Weaver SC (2012) Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. *PLoS Negl Trop Dis* 6:e1477.
 86. Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, et al (2015) Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *J Virol* 89:8880-8896.
 87. Hamel R, Ferraris P, Wichit S, Diop F, Talignani L, Pompon J, Garcia D, Liégeois F, Sall AA, Yssel H, Missé D (2017) African and Asian Zika virus strains differentially induce early antiviral responses in primary human astrocytes. *Infect Genet Evol.* 49:134-137.
 88. Hammack C, Ogden SC, Madden JC Jr, Medina A, Xu C, Phillips E, Son Y, Cone A, Giovinazzi S, Didier RA, et al (2019) Zika Virus Infection Induces DNA Damage Response in Human Neural Progenitors That Enhances Viral Replication. *J Virol* 93:e00638-19.

89. Hamosh A, Scott AF, Amberger JS, Bocchini CA and McKusick VA (2005) Online Mendelian Inheritance in Man (OMIM), a knowledgebase of human genes and genetic disorders. *Nucleic Acids Res* 33:D514-7.
90. Harrison PW, Ahamed A, Aslam R, Alako BTF, Burgin J, Buso N, Courtot M, Fan J, Gupta D, Haseeb M, et al (2021) The European Nucleotide Archive in 2020. *Nucleic Acids Res* 49:D82-D85.
91. Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, Hwang J, Uraki R, Gaitsch HF, Parnell LA, Cao B, Mysorekar IU, Rothlin CV, et al (2017) TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep* 19:558-568.
92. Hayes EB (2009) Zika virus outside Africa. *Emerg Infect Dis* 15:1347-1350.
93. Hennekam RC, Biesecker LG, Allanson JE, Hall JG, Opitz JM, Temple IK and Carey JC; Elements of Morphology Consortium (2013) Elements of morphology: general terms for congenital anomalies. *Am J Med Genet A* 161A:2726-2733.
94. Hu T, Li J, Carr MJ, Duchêne S and Shi W (2019) The Asian Lineage of Zika Virus: Transmission and Evolution in Asia and the Americas. *Virol Sin* 34:1-8.
95. Islam MS, Khan MA, Murad MW, Karim M and Islam ABMMK (2019) In silico analysis revealed Zika virus miRNAs associated with viral pathogenesis through alteration of host genes involved in immune response and neurological functions. *J Med Virol* 91:1584-1594.
96. Janssens S, Schotsaert M, Karnik R, Balasubramaniam V, Dejoze M, Meissner A, García-Sastre A and Zwaka TP (2018) Zika Virus Alters DNA Methylation of Neural Genes in an Organoid Model of the Developing Human Brain. *mSystems* 3:e00219-17.
97. Ji F and Sadreyev RI (2018) RNA-seq: Basic Bioinformatics Analysis. *Curr Protoc Mol Biol* 124:e68.
98. Kaprio J, Koskenvuo M (2002) Genetic and environmental factors in complex diseases: the older Finnish Twin Cohort. *Twin Res.* 5:358-65.
99. Khaiboullina SF, Uppal T, Sarkar R, Gorzalski A, St Jeor S and Verma SC (2017) ZIKV infection regulates inflammasomes pathway for replication in monocytes. *Sci Rep* 7:16050.
100. Krauer F, Riesen M, Reveiz L, Oladapo OT, Martínez-Vega R, Porgo TV, Haefliger A, Broutet NJ, Low N, WHO Zika Causality Working Group (2017) Zika Virus Infection as a Cause of Congenital Brain Abnormalities and Guillain-Barré Syndrome: Systematic Review. *PLoS Med.* 14:e1002203.
101. Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhanaa RS and Dye C (2016) Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ* 94:675–686C.
102. Kleber de Oliveira W, Cortez-Escalante J, De Oliveira WT, do Carmo GM, Henriques CM, Coelho GE and Araújo de França GV (2016) Increase in Reported Prevalence of Microcephaly in Infants Born to Women Living in Areas with Confirmed Zika Virus Transmission During the First Trimester of Pregnancy - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:242-247.
103. Köhler S, Gargano M, Matentzoglou N, Carmody LC, Lewis-Smith D, Vasilevsky NA, Danis D, Balagura G, Baynam G, Brower AM, et al (2021) The Human Phenotype Ontology in 2021. *Nucleic Acids Res* 49:D1207-D1217.

104. Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne A, Shearer FM, Brady OJ, Messina JP, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, et al (2015) The global compendium of *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* occurrence. *Sci Data* 2:150035.
105. Kublin JL and Whitney JB (2018) Zika virus research models. *Virus Res* 254:15-20.
106. Kuno G and Chang GJ (2007) Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. *Arch Virol* 152:687-696.
107. Landry ML and St George K (2017) Laboratory Diagnosis of Zika Virus Infection. *Arch Pathol Lab Med* 141:60-67.
108. Leal MC, van der Linden V, Bezerra TP, De Valois L, Borges ACG, Antunes MMC, Brandt KG, Moura CX, Rodrigues LC and Ximenes CR (2017) Characteristics of Dysphagia in Infants with Microcephaly Caused by Congenital Zika Virus Infection, Brazil, 2015. *Emerging Infectious Diseases* 23:1253-1259.
109. Lek M, Karczewski KJ, Minikel EV, Samocha KE, Banks E, Fennell T, O'Donnell-Luria AH, Ware JS, Hill AJ, Cummings BB, et al (2016) Analysis of protein-coding genetic variation in 60,706 humans. *Nature* 536:285–291.
110. Li C, Wang Q, Jiang Y, Ye Q, Xu D, Gao F, Xu JW, Wang R, Zhu X, Shi L, et al (2018) Disruption of glial cell development by Zika virus contributes to severe microcephalic newborn mice. *Cell Discov* 4:43.
111. Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, Zhang N, Shi L, Qin CF and Xu Z (2016) Zika Virus Disrupts Neural Progenitor Development and Leads to Microcephaly in Mice. *Cell Stem Cell* 19:120-126.
112. Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, Ge J, Wang S, Goldman SA, Zlokovic BV, et al (2016) Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell* 19:663-671.
113. Liao X, Xie H, Li S, Ye H, Li S, Ren K, Li Y, Xu M, Lin W, Duan X, Yang C and Chen L (2020) 2', 5'-Oligoadenylate Synthetase 2 (OAS2) Inhibits Zika Virus Replication through Activation of Type I IFN Signaling Pathway. *Viruses* 12:418.
114. Lichinchi G, Zhao BS, Wu Y, Lu Z, Qin Y, He C, Rana TM (2016) Dynamics of Human and Viral RNA Methylation during Zika Virus Infection. *Cell Host Microbe*. 20:666-673.
115. Liu L, Chen Z, Zhang X, Li S, Hui Y, Feng H, Du Y, Jin G, Zhou X and Zhang X (2019) Protection of ZIKV infection-induced neuropathy by abrogation of acute antiviral response in human neural progenitors. *Cell Death Differ* 26:2607-2621.
116. Loraine AE, Blakley IC, Jagadeesan S, Harper J, Miller G and Firon N (2015) Analysis and visualization of RNA-Seq expression data using RStudio, Bioconductor, and Integrated Genome Browser. *Methods Mol Biol* 1284:481-501.

117. Lum FM, Low DK, Fan Y, Tan JJ, Lee B, Chan JKY, Rénia L, Ginhoux F and Ng LFP (2017) Zika virus infects human fetal brain microglia and induces inflammation. *Clin Infect Dis* 64:914–920.
118. MacGregor AJ, Sniieder H, Schork NJ, Spector TD (2000) Twins. Novel uses to study complex traits and genetic diseases. *Trends Genet.* 16:131-4.
119. MacNamara FN (1954) Zika virus: a report on three cases of human infection during an epidemic of jaundice in Nigeria. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 48:139-145.
120. Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud, Delobel P, Martin-Blondel G and Izopet J (2017) Zika Virus Infection and Prolonged Viremia in Whole-Blood Specimens. *Emerg Infect Dis* 23:863-865.
121. Marthiens V, Rujano MA, Pennetier C, Tessier S, Paul-Gilloteaux P and Basto R (2013) Centrosome amplification causes microcephaly. *Nat Cell Biol* 15:731-740.
122. Martines RB, Bhatnagar J, Keating MK, Silva-Flannery L, Muehlenbachs A, Gary J, Goldsmith C, Hale G, Ritter J, Rollin D, et al (2016) Notes from the Field: Evidence of Zika Virus Infection in Brain and Placental Tissues from Two Congenitally Infected Newborns and Two Fetal Losses--Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:159-160.
123. Masel J, McCracken MK, Gleeson T, Morrison B, Rutherford G, Imrie A, Jarman RG, Koren M and Pollet S (2019) Does prior dengue virus exposure worsen clinical outcomes of Zika virus infection? A systematic review, pooled analysis and lessons learned. *PLoS Negl Trop Dis* 13:e0007060.
124. Matos MA, Nascimento MAST and Merriman JW (2020) Orthopaedic approach to the congenital Zika syndrome. *International Orthopaedics* 45:559-564.
125. Mayer G, Heinze G, Mischak H, Hellemons ME, Heerspink HJ, Bakker SJ, de Zeeuw D, Haiduk M, Rossing P and Oberbauer R (2011) Omics-bioinformatics in the context of clinical data. *Methods Mol Biol* 719:479-497.
126. Mead PS, Duggal NK, Hook SA, Delorey M, Fischer M, Olzenak McGuire D, Becksted H, Max RJ, Anishchenko M, et al (2018) Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *N Engl J Med* 378:1377-1385.
127. Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau VM, et al (2017) Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Rep* 18:324-333.
128. Melo AS, Aguiar RS, Amorim MM, Arruda MB, Melo FO, Ribeiro ST, Batista AG, Ferreira T, Dos Santos MP, Sampaio VV, et al (2016) Congenital Zika Virus Infection: Beyond Neonatal Microcephaly. *JAMA Neurol* 73:1407-1416.
129. Mendes AKT, Ribeiro MRC, Lamy-Filho F, Amaral GA, Borges MCR, Costa LC, Cavalcante TB, Batista RFL, Sousa PDS and Silva AAMD (2020) Congenital Zika syndrome: association between the gestational trimester of maternal infection, severity of brain computed tomography findings and microcephaly at birth. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo* 62:e56.

130. Microcephaly Epidemic Research Group (2016) Microcephaly in Infants, Pernambuco State, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis* 22:1090-1093.
131. Miner JJ and Diamond MS (2017) Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* 21:134-142.
132. Miner JJ, Cao B, Govero J, Smith AM, Fernandez E, Cabrera OH, Garber C, Noll M, Klein RS, Noguchi KK, Mysorekar IU and Diamond MS (2016) Zika Virus Infection during Pregnancy in Mice Causes Placental Damage and Fetal Demise. *Cell* 165:1081-1091.
133. Moore CA, Staples JE, Dobyns WB, Pessoa A, Ventura CV, Fonseca EB, Ribeiro EM, Ventura LO, Neto NN, Arena JF and Rasmussen SA (2017) Characterizing the Pattern of Anomalies in Congenital Zika Syndrome for Pediatric Clinicians. *JAMA Pediatr* 171:288-295.
134. Moore CA, Weaver DD and Bull MJ (1990) Fetal brain disruption sequence. *J Pediatr* 116:383-6.
135. Morrison TE and Diamond MS (2017) Animal Models of Zika Virus Infection, Pathogenesis, and Immunity. *J Virol* 91:e00009-17.
136. Musso D and Gubler DJ (2016) Zika Virus. *Clin Microbiol Rev* 29:487-524.
137. Musso D, Bossin H, Mallet HP, Besnard M, Broult J, Baudouin L, Levi JE, Sabino EC, Ghawche F, Lanteri MC and Baud D (2018) Zika virus in French Polynesia 2013–14: anatomy of a completed outbreak. *Lancet Infect Dis* 18:e172–e182.
138. N Costa MC, Cardim LL, Teixeira MG, Barreto ML, Carvalho-Sauer RCO, Barreto FR, Carvalho MSI, Oliveira WK, França GVA, Carmo EH, et al (2020) Case Fatality Rate Related to Microcephaly Congenital Zika Syndrome and Associated Factors: A Nationwide Retrospective Study in Brazil †. *Viruses* 12:1228.
139. Narasimhan H, Chudnovets A, Burd I, Pekosz A and Klein SL (2020) Animal models of congenital zika syndrome provide mechanistic insight into viral pathogenesis during pregnancy. *PLoS Negl Trop Dis* 14:e0008707.
140. Naveed M, Kazmi SK, Amin M, Asif Z, Islam U, Shahid K, Tehreem S (2018) Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH). *Genet Res (Camb)*. 100:e7.
141. Naslavsky MS, Scliar MO, Yamamoto GL, Wang JYT, Zverinova S, Karp T, Nunes K, Ceroni JRM, de Carvalho DL, Simões CES, Bozoklian D, et al (2020) Whole-genome sequencing of 1,171 elderly admixed individuals from the largest Latin American metropolis.
142. Nem de Oliveira Souza I, Frost PS, França JV, Nascimento-Viana JB, Neris RLS, Freitas L, Pinheiro DJLL, Nogueira CO, Neves G, Chimelli L, et al (2018) Acute and chronic neurological consequences of early-life Zika virus infection in mice. *Sci Transl Med* 10:eaar2749.
143. Nielsen-Saines K, Brasil P, Kerin T, Vasconcelos Z, Gabaglia CR, Damasceno L, Pone M, Abreu de Carvalho LM, Pone SM, Zin AA, et al (2019) Delayed childhood neurodevelopment and neurosensory alterations in the

- second year of life in a prospective cohort of ZIKV-exposed children. *Nat Med*. 25:1213-1217.
144. Nowakowski TJ, Pollen AA, Di Lullo E, Sandoval-Espinosa C, Bershteyn M and Kriegstein AR (2016) Expression Analysis Highlights AXL as a Candidate Zika Virus Entry Receptor in Neural Stem Cells. *Cell Stem Cell* 18:591-596.
 145. Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, Neto FK, Fiori HH, Scotta MC, Zanella PL, Soder RB and da Costa JC (2016) Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. *J Pediatr (Rio J)* 92:230-240.
 146. Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparç-Goffart I, Lastere S, Valour F, Baudouin L, Mallet H, Musso D and Ghawche F (2014) Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome--case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* 19:20720.
 147. Ojha CR, Rodriguez M, Karuppan MKM, Lapierre J, Kashanchi F and El-Hage N (2019) Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. *PLoS One* 14:e0208543.
 148. Ojha CR, Rodriguez M, Lapierre J, Muthu Karuppan MK, Branscome H, Kashanchi F and El-Hage N (2018) Complementary Mechanisms Potentially Involved in the Pathology of Zika Virus. *Front Immunol* 9:2340.
 149. Onorati M, Li Z, Liu FC, Sousa AMM, Nakagawa N, Li M, Dell'Anno MT, Gulden FO, Pochareddy S, Tebbenkamp ATN, et al (2016) Zika virus disrupts phospho-TBK1 localization and mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. *Cell Rep* 16:2576–2592.
 150. PAHO. 2015 (a). Congenital anomalies are the second-leading cause of death in children under 5 in the Americas. Disponível em: https://www.paho.org/clap/index.php?option=com_content&view=article&id=267:dia-mundial-de-los-defectos-de-nacimiento-3-de-marzo-2015&Itemid=215&lang=en
 151. PAHO. 2015(b). Epidemiological Alert - Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf>
 152. Papatheodorou I, Fonseca NA, Keays M, Tang YA, Barrera E, Bazant W, Burke M, Füllgrabe A, Fuentes AM, George N, et al (2018) Expression Atlas: gene and protein expression across multiple studies and organisms. *Nucleic Acids Res* 46:D246-D251.
 153. Pena LJ, Miranda Guarines K, Duarte Silva AJ, Sales Leal LR, Mendes Félix D, Silva A, de Oliveira SA, Junqueira Ayres CF, Júnior AS and de Freitas AC (2018) In vitro and in vivo models for studying Zika virus biology. *J Gen Virol* 99:1529-1550.
 154. Pessôa R, Patriota JV, Lourdes de Souza M, Felix AC, Mamede N and Sanabani SS (2016) Investigation Into an Outbreak of Dengue-like Illness in

- Pernambuco, Brazil, Revealed a Cocirculation of Zika, Chikungunya, and Dengue Virus Type 1. *Medicine (Baltimore)* 95:e3201.
155. Pierson TC and Diamond MS (2018) The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. *Nature* 560:573-581.
 156. Plourde AR and Bloch EM (2016) A Literature Review of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* 22:1185-1192.
 157. Polifka JE and Friedman JM (2002) Medical genetics: 1. Clinical teratology in the age of genomics. *CMAJ* 167:265-73.
 158. Pomar L, Musso D, Malinger G, Vouga M, Panchaud A and Baud D (2019) Zika virus during pregnancy: From maternal exposure to congenital Zika virus syndrome. *Prenat Diagn* 39:420-430.
 159. Radaelli G, Lahorgue Nunes M, Bernardi Soder R, de Oliveira JM, Thays Konat Bruzzo F, Kalil Neto F, Leal-Conceição E, Wetters Portuguese M and Costa da Costa J (2020) Review of neuroimaging findings in congenital Zika virus syndrome and its relation to the time of infection. *Neuroradiol J* 33:152-157.
 160. Rathore APS, Saron WAA, Lim T, Jahan N, St John AL (2019) Maternal immunity and antibodies to dengue virus promote infection and Zika virus-induced microcephaly in fetuses. *Sci Adv.* 5:eaav3208.
 161. Richard AS, Shim BS, Kwon YC, Zhang R, Otsuka Y, Schmitt K, Berri F, Diamond MS and Choe H (2017) AXL-dependent infection of human fetal endothelial cells distinguishes Zika virus from other pathogenic flaviviruses. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114:2024-2029.
 162. Rolfe AJ, Bosco DB, Wang J, Nowakowski RS, Fan J and Ren Y (2016) Bioinformatic analysis reveals the expression of unique transcriptomic signatures in Zika virus infected human neural stem cells. *Cell Biosci* 6:42.
 163. Rossi ÁD, Faucz FR, Melo A, Pezzuto P, de Azevedo GS, Schamber-Reis BLF, Tavares JS, Mattapallil JJ, Tanuri A, Aguiar RS, et al (2019) Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. *J Intern Med* 285:215-222.
 164. Roth A, Mercier A, Lepers C, Hoy D, Duituraga S, Benyon E, Guillaumot L and Souares Y (2014) Concurrent outbreaks of dengue, chikungunya and Zika virus infections - an unprecedented epidemic wave of mosquito-borne viruses in the Pacific 2012-2014. *Euro Surveill* 19:20929.
 165. Rubin SA, Bautista JR, Moran TH, Schwartz GJ and Carbone KM (1999) Viral teratogenesis: brain developmental damage associated with maturation state at time of infection. *Brain Res Dev Brain Res* 112:237-244.
 166. Russell LJ, Weaver DD, Bull MJ and Weinbaum M (1984) In utero brain destruction resulting in collapse of the fetal skull, microcephaly, scalp rugae, and neurologic impairment: the fetal brain disruption sequence. *Am J Med Genet* 17:509-521.
 167. Saad T, PennaeCosta AA, de Góes FV, de Freitas M, de Almeida JV, de Santa Ignêz LJ, Amancio AP, Alvim RJ, Antunes Kramberger LA (2018) Neurological manifestations of congenital Zika virus infection. *Childs Nerv Syst.* 34:73-78.

168. Santos CNO, Ribeiro DR, Cardoso Alves J, Cazzaniga RA, Magalhães LS, de Souza MSF, Fonseca ABL, Bispo AJB, Porto RLS, Santos CAD, da Silva ÂM, et al (2019) Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor- α Gene. *J Infect Dis* 220:1797-1801.
169. Satterfield-Nash A, Kotzky K, Allen J, Bertolli J, Moore CA, Pereira IO, Pessoa A, Melo F, Santelli ACFES, Boyle CA and Peacock G (2017) Health and Development at Age 19-24 Months of 19 Children Who Were Born with Microcephaly and Laboratory Evidence of Congenital Zika Virus Infection During the 2015 Zika Virus Outbreak - Brazil, 2017. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 66:1347-1351.
170. Schneider MV and Orchard S (2011) Omics technologies, data and bioinformatics principles. *Methods Mol Biol* 719:3-30.
171. Schuler-Faccini L, Ribeiro EM, Feitosa IM, Horovitz DD, Cavalcanti DP, Pessoa A, Doriqui MJ, Neri JI, Neto JM, Wanderley HY, et al (2016) Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly - Brazil, 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep* 65:59-62.
172. Schwartz DA (2017) Autopsy and Postmortem Studies Are Concordant: Pathology of Zika Virus Infection Is Neurotropic in Fetuses and Infants With Microcephaly Following Transplacental Transmission. *Arch Pathol Lab Med* 141:68-72.
173. Sejvar JJ, Baughman AL, Wise M and Morgan OW (2011) Population incidence of Guillain-Barré syndrome: a systematic review and meta-analysis. *Neuroepidemiology* 36:123-133.
174. Serpa SC, Melo AC MG, Gomes Lins O, Linden V, Leite Rolim Filho E and Oliveira dos Santos AC (2019) Orthopedic findings in arthrogryposis and congenital Zika syndrome: A case series. *Birth Defects Research* 112:385-392.
175. Shao Q, Herrlinger S, Yang SL, Lai F, Moore JM, Brindley MA and Chen JF (2016) Zika virus infection disrupts neurovascular development and results in postnatal microcephaly with brain damage. *Development* 143:4127-4136.
176. Slomnicki LP, Chung DH, Parker A, Hermann T, Boyd NL and Hetman M (2017) Ribosomal stress and Tp53-mediated neuronal apoptosis in response to capsid protein of the Zika virus. *Sci Rep* 7:16652.
177. Sobral da Silva PF, Eickmann SH, Arraes de Alencar Ximenes R, Ramos Montarroyos U, de Carvalho Lima M, Turchi Martelli CM, Velho Barreto de Araújo T, Brickley EB, Cunha Rodrigues L, Lima da Silva et al (2020) Pediatric neurodevelopment by prenatal Zika virus exposure: a cross-sectional study of the Microcephaly Epidemic Research Group Cohort. *BMC Pediatr* 20:472.
178. Souza BS, Sampaio GL, Pereira CS, Campos GS, Sardi SI, Freitas LAR, Figueira CP, Paredes BD, Nonaka CKV, Azevedo CM, et al (2016) Zika virus infection induces mitosis abnormalities and apoptotic cell death of human neural progenitor cells. *Sci Rep* 6:39775.
179. Stegmann BJ and Carey JC (2002) TORCH Infections. Toxoplasmosis, Other (syphilis, varicella-zoster, parvovirus B19), Rubella, Cytomegalovirus (CMV), and Herpes infections. *Curr Womens Health Rep* 2:253-258.

180. Strange DP, Jiyarom B, Pourhabibi Zarandi N, Xie X, Baker C, Sadri-Ardekani H, Shi PY and Verma S (2019) Axl Promotes Zika Virus Entry and Modulates the Antiviral State of Human Sertoli Cells. *mBio* 10:e01372-19.
181. Tabari D, Scholl C, Steffens M, Weickhardt S, Elgner F, Bender D, Herrlein ML, Sabino C, Semkova V, Peitz M, et al (2020) Impact of Zika Virus Infection on Human Neural Stem Cell MicroRNA Signatures. *Viruses* 12:1219.
182. Tan JJL, Balne PK, Leo YS, Tong L, Ng LFP and Agrawal R (2017) Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Sci Rep* 7:11194.
183. Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, et al (2016) Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. *Cell Stem Cell* 18:587-590.
184. Thawani A, Sirohi D, Kuhn RJ, Fekete DM (2018) Zika Virus Can Strongly Infect and Disrupt Secondary Organizers in the Ventricular Zone of the Embryonic Chicken Brain. *Cell Rep.* 23:692-700.
185. Teng Y, Liu S, Guo X, Liu S, Jin Y, He T, Bi D, Zhang P, Lin B, An X, et al (2017) An Integrative Analysis Reveals a Central Role of P53 Activation via MDM2 in Zika Virus Infection Induced Cell Death. *Front Cell Infect Microbiol* 7:327.
186. Thompson MR, Kaminski JJ, Kurt-Jones EA and Fitzgerald KA (2011) Pattern recognition receptors and the innate immune response to viral infection. *Viruses* 3:920-940.
187. Tiwari SK, Dang J, Qin Y, Lichinchi G, Bansal V and Rana TM (2017) Zika virus infection reprograms global transcription of host cells to allow sustained infection. *Emerg Microbes Infect* 6:e24.
188. van der Linden H Jr, Carvalho MD, van der Linden V, Lacerda KM, Pessoa A, Carneiro ML, Cordeiro MT and Valente KD (2018) Epilepsy Profile in Infants with Congenital Zika Virus Infection. *N Engl J Med* 379:891-892.
189. van der Linden V, Filho EL, Lins OG, van der Linden A, Aragão Mde F, Brainer-Lima AM, Cruz DD, Rocha MA, Sobral da Silva PF, Carvalho MD, et al (2016) Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. *BMJ* 354:i3899.
190. Ventura CV, Maia M, Ventura BV, Linden VV, Araújo EB, Ramos RC, Rocha MA, Carvalho MD, Belfort R Jr and Ventura LO (2016) Ophthalmological findings in infants with microcephaly and presumable intra-uterus Zika virus infection. *Arq Bras Oftalmol* 79:1-3.
191. Vermillion MS, Lei J, Shabi Y, Baxter VK, Crilly NP, McLane M, Griffin DE, Pekosz A, Klein SL, Burd I (2017) Intrauterine Zika virus infection of pregnant immunocompetent mice models transplacental transmission and adverse perinatal outcomes. *Nat Commun.* 8:14575.
192. Vhp L, Aragão MM, Pinho RS, Hazin AN, Paciorkowski AR, Penalva de Oliveira AC and Masruha MR (2020) Congenital Zika Virus Infection: a Review with Emphasis on the Spectrum of Brain Abnormalities. *Curr Neurol Neurosci Rep* 20:49.

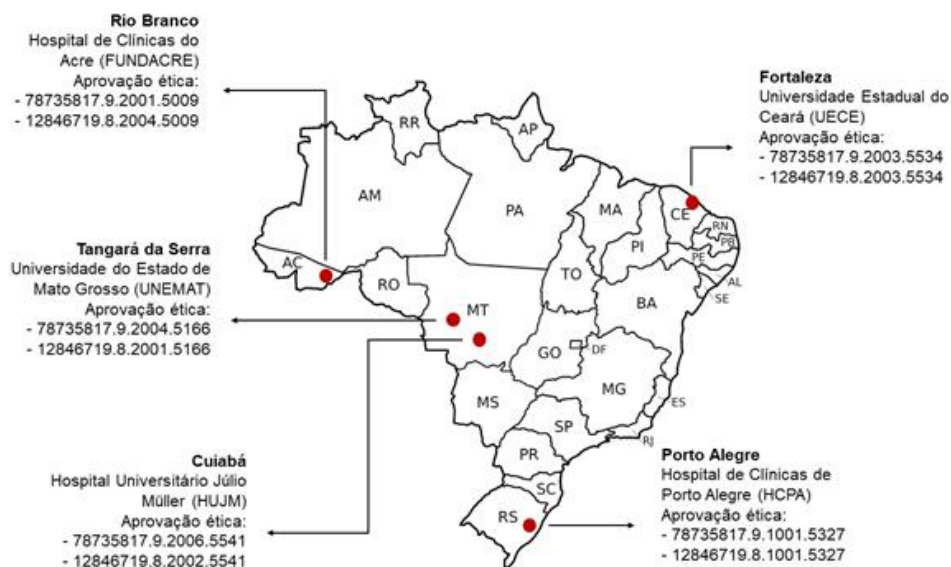
193. Voekt CA, Rinderknecht T, Hirsch HH, Blaich A and Hösli IM (2017) Ultrasound indications for maternal STORCH testing in pregnancy. *Swiss Med Wkly* 147:w14534.
194. Waggoner JJ and Pinsky BA (2016) Zika Virus: Diagnostics for an Emerging Pandemic Threat. *J Clin Microbiol* 54:860-867.
195. Waldron L, Riester M (2016) Meta-Analysis in Gene Expression Studies. *Methods Mol Biol.* 1418:161-76.
196. Wang A, Thurmond S, Islas L, Hui K and Hai R (2017) Zika virus genome biology and molecular pathogenesis. *Emerg Microbes Infect* 6:e13.
197. Wang B, Thurmond S, Zhou K, Sánchez-Aparicio MT, Fang J, Lu J, Gao L, Ren W, Cui Y, Veit EC, et al (2020) Structural basis for STAT2 suppression by flavivirus NS5. *Nat Struct Mol Biol* 2020 27:875-885.
198. Wang ZY, Wang Z, Zhen ZD, Feng KH, Guo J, Gao N, Fan DY, Han DS, Wang PG and An J (2017) Axl is not an indispensable factor for Zika virus infection in mice. *J Gen Virol* 98:2061-2068.
199. Watrin L, Ghawché F, Larre P, Neau JP, Mathis S and Fournier E (2016) Guillain-Barré Syndrome (42 Cases) Occurring During a Zika Virus Outbreak in French Polynesia. *Medicine (Baltimore)* 95:e3257.
200. Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, Ihry RJ, Kommineni S, Bilican B, Klim JR, Hill EJ, et al (2016) Genetic Ablation of AXL Does Not Protect Human Neural Progenitor Cells and Cerebral Organoids from Zika Virus Infection. *Cell Stem Cell* 19:703-708.
201. Wheeler AC, Toth D, Ridenour T, Lima Nóbrega L, Borba Firmino R, Marques da Silva C, Carvalho P, Marques D, Okoniewski K, et al (2020) Developmental Outcomes Among Young Children With Congenital Zika Syndrome in Brazil. *JAMA Netw Open* 3:e204096.
202. WHO (2016a) Zika causality statement. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/zika-virus/causality/en/>
203. WHO (2016b) Situation Report: ZikaVirus, Microcephaly, Guillain-Barré Syndrome. Disponível em: <http://apps.who.int/iris/bitstream/10665/250724/1/zikasitrep3Nov16-eng.pdf?ua=1>. Acesso em agosto de 2017.
204. WHO (2016c) WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. Disponível em: [https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-\(2005\)-\(ihr-2005\)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations](https://www.who.int/news/item/01-02-2016-who-statement-on-the-first-meeting-of-the-international-health-regulations-(2005)-(ihr-2005)-emergency-committee-on-zika-virus-and-observed-increase-in-neurological-disorders-and-neonatal-malformations)
205. WHO. 2020. Congenital anomalies. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/congenital-anomalies>
206. Wilson J (1959) Experimental studies on congenital malformations. *J Chronic Dis* 10:111-130.

207. Wilson J (1977). Current status of teratology: general principles and mechanisms derived from animal studies. In: Wilson J and Fraser F (eds) Handbook of teratology. Plenum Press, New York, pp. 47-74.
208. Winkler CW, Myers LM, Woods TA, Messer RJ, Carmody AB, McNally KL, Scott DP, Hasenkrug KJ, Best SM and Peterson KE (2017) Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. *J Immunol* 198:3526-3535.
209. Wlodarczyk BJ, Palacios AM, Chapa CJ, Zhu H, George TM and Finnell RH (2011) Genetic basis of susceptibility to teratogen induced birth defects. *Am J Med Genet C Semin Med Genet* 157C:215-26.
210. Wu KY, Zuo GL, Li XF, Ye Q, Deng YQ, Huang XY, Cao WC, Qin CF and Luo ZG (b) (2016) Vertical transmission of Zika virus targeting the radial glial cells affects cortex development of offspring mice. *Cell Res* 26:645–654.
211. Wu Y, Liu Q, Zhou J, Xie W, Chen C, Wang Z, Yang H and Cui J (2017) Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov* 3:17006. Erratum in: *Cell Discov* 3:17014
212. Xu YP, Qiu Y, Zhang B, Chen G, Chen Q, Wang M, Mo F, Xu J, Wu J, Zhang RR, et al (2019) Zika virus infection induces RNAi-mediated antiviral immunity in human neural progenitors and brain organoids. *Cell Res* 29:265-273.
213. Xu D, Li C, Qin CF, Xu Z (2019b) Update on the Animal Models and Underlying Mechanisms for ZIKV-Induced Microcephaly. *Annu Rev Virol.* 6:459-479.
214. Yang S, Gorshkov K, Lee EM, Xu M, Cheng YS, Sun N, Soheilian F, de Val N, Ming G, Song H, Tang H and Zheng W (2020) Zika Virus-Induced Neuronal Apoptosis via Increased Mitochondrial Fragmentation. *Front Microbiol* 11:598203.
215. Yates AD, Achuthan P, Akanni W, Allen J, Allen J, Alvarez-Jarreta J, Amode MR, Armean IM, Azov AG, Bennett R, et al (2020) Ensembl 2020. *Nucleic Acids Res* 48:D682-D688.
216. Yi L, Pimentel H and Pachter L (2017) Zika infection of neural progenitor cells perturbs transcription in neurodevelopmental pathways. *PLoS One* 12:e0175744.
217. Yockey LJ, Jurado KA, Arora N, Millet A, Rakib T, Milano KM, Hastings AK, Fikrig E, Kong Y, Horvath TL, et al (2018) Type I interferons instigate fetal demise after Zika virus infection. *Sci Immunol.* 3:eaao1680.
218. Zanluca C, Melo VC, Mosimann AL, Santos GI, Santos CN and Luz K (2015) First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz* 110:569-572.
219. Zhang F, Hammack C, Ogden SC, Cheng Y, Lee EM, Wen Z, Qian X, Nguyen HN, Li Y, et al (2016) Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. *Nucleic Acids Res* 44:8610-8620.

CAPÍTULO XVII

APÊNDICE

Apêndice 1 - Representação esquemática dos centros colaborativos e locais de origem dos pacientes incluídos no estudo, bem como aprovação ética dos projetos vinculados a este estudo.



SCZ. Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika.

Aprovação ética: nº do CAAE fornecido pela Plataforma Brasil para cada projeto (nacional e internacional) aprovado.

CAPÍTULO XVIII

ANEXOS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CASOS

HCPA-GPPG nº 2017-0619; Plataforma Brasil CAAE nº 78735817.9.1001.5327

Título do Projeto: **IDENTIFICAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ASSOCIADOS À TERATOGENESE DO VÍRUS ZIKA**

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender se existem alterações genéticas (no DNA) que estão envolvidos na ocorrência de alterações no bebê (microcefalia e outras) após a exposição da mãe durante a gravidez ao vírus do Zika. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Recentemente foi descoberto que a infecção do vírus da Zika durante a gestação pode causar microcefalia (tamanho da cabeça menor que o usual para a idade) e outras alterações nos bebês. No entanto, nem todos os bebês apresentam essas alterações, sendo que algumas variantes genéticas (modificações no DNA) podem estar associadas à ocorrência ou não das alterações nas crianças. O objetivo dessa pesquisa é investigar se variantes genéticas comuns (que existem em diversas pessoas da população) podem estar associadas ao aparecimento da microcefalia e outras anomalias nas crianças que foram expostas à Zika durante a gestação.

Se você concordar com a participação na pesquisa, será realizada uma coleta de uma pequena quantidade de sangue do bebê (4 mL, equivalente a uma colher de chá). Nessa amostra serão avaliadas diferentes regiões do DNA. Também serão aplicados questionários com perguntas socioeconômicas e relacionadas à história familiar e da gestação, além de serem realizadas avaliações de medidas de peso, altura e tamanho da cabeça do bebê e exames físico, oftalmológico e neurológico. Caso estas informações e exames já tenham sido realizados em uma avaliação anterior da criança, nós acessaremos essas informações diretamente dos registros, caso você autorize.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconseguir com o uso do material.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, no entanto podem ocorrer desconfortos associados à coleta de sangue, como dor e mancha roxa (hematoma) no local da coleta. Caso o bebê esteja muito desconfortável com a coleta, encontraremos um outro momento para realização.

Este estudo não trará benefícios diretos ao participante, entretanto, auxiliará na compreensão dos mecanismos que o vírus Zika usa para causar as alterações observadas, e ainda, se aplicável, os resultados poderão ajudar a gerar informações que auxiliem na escolha de alternativas terapêuticas que visem diminuir o impacto das alterações neurológicas a longo prazo provocadas pelo vírus.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna pelo telefone [51-33598008] ou com a pesquisadora Dra. Lavínia Schüller-Faccini pelo telefone [51-33089826] ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Com relação às amostras biológicas armazenadas

() Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

() Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO - CONTROLES

HCPA-GPPG nº 2017-0619; Plataforma Brasil CAAE nº 78735817.9.1001.5327

Título do Projeto: **IDENTIFICAÇÃO DE FATORES GENÉTICOS E EPIGENÉTICOS ASSOCIADOS À TERATOGENESE DO VÍRUS ZIKA**

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender se existem alterações genéticas (no DNA) que estão envolvidos na ocorrência de alterações no bebê (microcefalia e outras) após a exposição da mãe durante a gravidez ao vírus do Zika. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Recentemente foi descoberto que a infecção do vírus da Zika durante a gestação pode causar microcefalia (tamanho da cabeça menor que o usual para a idade) e outras alterações nos bebês. No entanto, nem todos os bebês apresentam essas alterações, sendo que algumas variantes genéticas (modificações no DNA) podem estar associadas à ocorrência ou não das alterações nas crianças. O objetivo dessa pesquisa é investigar se variantes genéticas comuns (que existem em diversas pessoas da população) podem estar associadas ao aparecimento da microcefalia e outras anomalias nas crianças que foram expostas à Zika durante a gestação. A criança pela qual você é responsável está sendo convidada porque foi exposta ao vírus da Zika a gravidez, mas não apresentou nenhuma alteração relacionada ao Zika. Este grupo de crianças é chamado de grupo controle e será comparado às crianças que apresentaram anomalias associadas à Zika.

Se você concordar com a participação na pesquisa, será realizada uma coleta de uma pequena quantidade de sangue do bebê (4 mL, equivalente a uma colher de chá). Nessa amostra serão avaliadas diferentes regiões do DNA. Também serão aplicados questionários com perguntas socioeconômicas e relacionadas à história familiar e da gestação, além de serem realizadas avaliações de medidas de peso, altura e tamanho da cabeça do bebê e exames físico, oftalmológico e neurológico. Caso estas informações e exames já tenham sido realizados em uma avaliação anterior da criança, nós acessaremos essas informações diretamente dos registros, caso você autorize.

O material biológico coletado será armazenado de forma codificada. Após a realização das análises previstas neste projeto, as amostras serão armazenadas. Este material, além de ser utilizado neste estudo, poderá ser utilizado em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você será chamado para reconsentir com o uso do material.

Não são conhecidos riscos pela participação na pesquisa, no entanto podem ocorrer desconfortos associados à coleta de sangue, como dor e mancha roxa (hematoma) no local da coleta. Caso o bebê esteja muito desconfortável com a coleta, encontraremos um outro momento para realização.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 2

Este estudo não trará benefícios diretos ao participante, entretanto, auxiliará na compreensão dos mecanismos que o vírus Zika usa para causar as alterações observadas, e ainda, se aplicável, os resultados poderão ajudar a gerar informações que auxiliem na escolha de alternativas terapêuticas que visem diminuir o impacto das alterações neurológicas a longo prazo provocadas pelo vírus.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber na instituição.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna pelo telefone [51-33598008] ou com a pesquisadora Dra. Lavínia Schüller-Faccini pelo telefone [51-33089826] ou com o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), pelo telefone (51) 33597640, ou no 2º andar do HCPA, sala 2227, de segunda à sexta, das 8h às 17h.

Com relação às amostras biológicas armazenadas

() Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

() Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 2

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO
Exoma – Síndrome Congênita por Zika Vírus

HCPA-GPPG nº 2019-0295; Plataforma Brasil CAAE nº 12846719.8.3001.5347

Título do Projeto: ANÁLISES GENÔMICAS ABRANGENTES NA SÍNDROME CONGÊNITA POR ZIKA VÍRUS

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender se existem variantes genéticas (no DNA) que estão envolvidas na ocorrência de alterações no bebê (como por exemplo, a microcefalia) após a exposição da mãe durante a gravidez ao Zika vírus. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar deste novo projeto porque já participa de outro projeto de pesquisa do nosso grupo chamado “Identificação de fatores genéticos e epigenéticos associados à teratogênese do Zika vírus” (CAAE: 78735817.9.1001.5327).

Recentemente foi descoberto que a infecção do Zika vírus durante a gestação pode causar microcefalia (tamanho da cabeça menor que o usual para a idade) e outras alterações nos bebês. No entanto, nem todos os bebês que foram expostos apresentam essas alterações, sendo que algumas variantes genéticas (modificações no DNA) podem estar associadas à ocorrência ou não das características observadas nas crianças (como a microcefalia). O objetivo dessa pesquisa é investigar se variantes genéticas podem estar relacionadas ao aparecimento da microcefalia e outras anomalias nas crianças que foram expostas ao Zika vírus durante a gestação. A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar deste novo projeto porque há comprovação ou suspeita de que ela tenha sido exposta ao Zika vírus na gravidez.

Se você concordar com a participação nesta pesquisa, nós usaremos a amostra de DNA já coletada no projeto anterior e que está armazenada no laboratório de pesquisa. Essa amostra de DNA será estudada através de sequenciamento e a análise de exoma. Esse é um exame no qual todas as regiões do DNA que produzem proteínas são analisadas. Proteínas são substâncias das células encarregadas de executar todas as funções responsáveis pela manutenção da vida das células, por exemplo, defesa do organismo, respiração celular, atividades de hormônios, degradação de nutrientes, e todas as demais funções responsáveis pela manutenção do corpo.

O sequenciamento de exoma, já mencionado acima, é uma técnica que permite que se conheça o DNA da pessoa, ou seja, se existem ou não variantes genéticas na pessoa que são diferentes da maioria da população. Essa técnica de sequenciamento será feita fora do Brasil, na Universidade da Califórnia, nos Estados Unidos ou na Grécia, mas a interpretação dos resultados da técnica, ou seja, a análise das variantes que forem encontradas, será feita pelos pesquisadores brasileiros que fazem parte desta pesquisa. As informações do DNA do participante serão comparadas com as características clínicas das crianças expostas ao Zika vírus. Assim, tanto informações coletadas na pesquisa anterior quanto informações do prontuário da criança, caso estejam disponíveis, serão verificadas.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 4

Como esta é uma pesquisa que investiga de maneira ampla o DNA do participante, existe a possibilidade de que alguma variante genética de risco seja identificada na amostra de DNA da criança que você é responsável. Uma variante genética de risco significa uma alteração no DNA da pessoa que aumenta a chance de desenvolver alguma doença. Essa alteração no DNA pode mudar o formato ou a função de uma proteína importante para o corpo ou a quantidade desta proteína no corpo e por isso a pessoa que tem essa variante pode desenvolver uma determinada doença ao longo da vida, ou seja, pode não apresentar nenhuma doença agora, mas no futuro.

O tipo e local da alteração no DNA é que irá determinar qual será o tipo de doença que a pessoa poderá ter. Esta doença pode ser uma doença leve ou mais grave que possui tratamento e cura, ou pode ser uma doença mais grave que tem tratamento, mas não tem cura. Ou ainda, uma doença mais grave para a qual não existe tratamento ou cura. Além disso, podem existir alterações no DNA que não estão associadas à doença nenhuma, mas que podem ser identificadas por meio deste exame.

Assim, existem diferentes possíveis riscos associados à participação na pesquisa e relacionados às alterações identificadas no DNA, desde reconhecimento do risco de doenças previamente não identificadas quanto alterações genéticas que não se sabe quais são as repercussões. Caso você tenha interesse em receber as informações genéticas, nós iremos oferecer aconselhamento genético para melhor esclarecimento das repercussões das alterações no DNA na saúde da criança e familiares. Caso uma variante de risco seja identificada, nós encaminharemos a criança para consultas e atendimento especializado.

Em relação aos outros potenciais riscos e desconfortos associados com a participação nesta pesquisa, podemos citar a quebra accidental do anonimato dos dados do participante da pesquisa, entretanto, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa e sua equipe se comprometem em garantir a integridade e não violação dos documentos com informações dos pacientes, bem como assegurar a confidencialidade de todos os dados coletados do participante e seu responsável, apresentando os resultados sem identificação dos indivíduos.

A participação na pesquisa pode não trazer nenhum benefício direto ao participante, mas ainda assim o estudo poderá trazer benefícios indiretos, uma vez que auxiliará no melhor entendimento de como o Zika vírus causa as malformações e alterações observadas nos bebês expostos ao vírus. A pesquisa pode também trazer benefício direto ao participante se for identificada um risco genético de doenças; neste caso, o participante poderá ser encaminhado para acompanhamento médico especializado. Você também poderá mudar de ideia em receber ou não as informações genéticas em qualquer momento da pesquisa.

A fim de proteger os participantes da pesquisa e seus responsáveis contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização salientamos que todas as informações pessoais (inclusive fotografias, caso estejam disponíveis) ou relacionadas à saúde do paciente serão mantidas sob confidencialidade, não sendo de forma alguma divulgadas pela equipe desta pesquisa.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber em qualquer instituição vinculada ao estudo. Além disso, caso você deseje retirar a autorização sobre a nossa guarda dos dados genéticos do participante, os quais serão armazenados em bancos de dados, você deverá solicitar tal retirada por escrito e assinar. Essa solicitação pode ser feita a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data de comunicação da decisão. Neste caso, todas as amostras biológicas (exemplo: sangue do paciente) serão devolvidas a você ou destruídas, caso prefira.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 4

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, todas as eventuais despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável ou patrocinador, isto é, o participante da pesquisa e seu acompanhante não arcarão com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames do estudo.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. O participante tem o direito à indenização em caso de dano decorrente da participação na pesquisa.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna pelo telefone 51-33598008 ou com a pesquisadora Dra. Lavinia Schüller-Faccini pelo telefone 51-33089826. Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O CEP é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pode ser contatado pelo telefone (51) 33597640 de segunda à sexta, das 8h às 17h; ou pelo e-mail cep@hcpa.edu.br; ou no 2º andar do HCPA, Rua Ramiro Barcelos 2.350, sala 2229, Bairro Santa Cecília - CEP: 90035-903, Porto Alegre - RS. Você também poderá entrar em contato com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa e independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde/MS. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa pode ser contatado pelo telefone (61) 3315-5877, ou no endereço: CONEP SRTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte - CEP: 70719-000, Brasília-DF.

Após a realização das análises previstas neste projeto, as informações genéticas do participante ficarão armazenadas de forma codificada e somente os pesquisadores terão acesso a essas informações. Estas informações, além de serem utilizadas neste estudo, poderão ser utilizadas em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para reconsentir com o uso das informações.

Com relação às amostras biológicas armazenadas

- Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
- Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Com relação aos resultados da análise genética:

- Não quero ter acesso a nenhuma informação genética.
- Quero ser informado caso seja encontrada alguma variante no DNA da criança que já foi associada a doenças que se manifestam antes dos 18 anos de idade e que possuem tratamento;
- Quero ser informado caso seja encontrada alguma variante no DNA da criança que já foi associada a doenças que se manifestam após os 18 anos, ou seja, na idade adulta, e possuem tratamento;
- Quero ser informado sobre qualquer variante de risco, independente do efeito, ou seja, incluindo variantes associadas a doenças sem tratamento e/ou cura.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 3 de 4

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 4 de 4

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO **Exoma – Controle**

HCPA-GPPG 2019-0295; Plataforma Brasil CAAE nº 12846719.8.3001.5347

Título do Projeto: **ANÁLISES GENÔMICAS ABRANGENTES NA SÍNDROME CONGÊNITA POR ZIKA VÍRUS**

A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar de uma pesquisa cujo objetivo é entender se existem variantes genéticas (no DNA) que estão envolvidas na ocorrência de alterações no bebê (como por exemplo, a microcefalia) após a exposição da mãe durante a gravidez ao Zika vírus. Esta pesquisa está sendo realizada pelo Sistema Nacional de Informações sobre Agentes Teratogênicos e Serviço de Genética Médica do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) e pelo Programa de Pós-Graduação em Genética e Biologia Molecular. A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar deste novo projeto porque já participa de outro projeto de pesquisa do nosso grupo chamado “Identificação de fatores genéticos e epigenéticos associados à teratogênese do Zika vírus” (CAAE: 78735817.9.1001.5327).

Recentemente foi descoberto que a infecção do Zika vírus durante a gestação pode causar microcefalia (tamanho da cabeça menor que o usual para a idade) e outras alterações nos bebês. No entanto, nem todos os bebês que foram expostos apresentam essas alterações, sendo que algumas variantes genéticas (modificações no DNA) podem estar associadas à ocorrência ou não das características observadas nas crianças (como a microcefalia). O objetivo dessa pesquisa é investigar se variantes genéticas podem estar relacionadas ao aparecimento da microcefalia e outras anomalias nas crianças que foram expostas ao Zika vírus durante a gestação. A criança pela qual você é responsável está sendo convidada a participar deste novo projeto porque há comprovação ou suspeita de que ela tenha sido exposta ao Zika vírus na gravidez, mas ela NÃO apresenta alterações depois da exposição ao Zika vírus.

Se você concordar com a participação nesta pesquisa, nós usaremos a amostra de DNA já coletada no projeto anterior e que está armazenada no laboratório de pesquisa. Essa amostra de DNA será estudada através de sequenciamento e a análise de exoma. Esse é um exame no qual todas as regiões do DNA que produzem proteínas são analisadas. Proteínas são substâncias das células encarregadas de executar todas as funções responsáveis pela manutenção da vida das células, por exemplo, defesa do organismo, respiração celular, atividades de hormônios, degradação de nutrientes, e todas as demais funções responsáveis pela manutenção do corpo.

O sequenciamento de exoma, já mencionado acima, é uma técnica que permite que se conheça o DNA da pessoa, ou seja, se existem ou não variantes genéticas na pessoa que são diferentes da maioria da população. Essa técnica de sequenciamento será feita fora do Brasil, na Universidade da Califórnia, nos Estados Unidos ou na Grécia, mas a interpretação dos resultados da técnica, ou seja, a análise das variantes que forem encontradas, será feita pelos pesquisadores brasileiros que fazem parte desta pesquisa. As informações do DNA do participante serão comparadas com as características clínicas das crianças expostas ao Zika vírus. Assim, tanto informações coletadas na pesquisa anterior quanto informações do prontuário da criança, caso estejam disponíveis, serão verificadas.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 1 de 4

Como esta é uma pesquisa que investiga de maneira ampla o DNA do participante, existe a possibilidade de que alguma variante genética de risco seja identificada na amostra de DNA da criança que você é responsável. Uma variante genética de risco significa uma alteração no DNA da pessoa que aumenta a chance de desenvolver alguma doença. Essa alteração no DNA pode mudar o formato ou a função de uma proteína importante para o corpo ou a quantidade desta proteína no corpo e por isso a pessoa que tem essa variante pode desenvolver uma determinada doença ao longo da vida, ou seja, pode não apresentar nenhuma doença agora, mas sim no futuro.

O tipo e local da alteração no DNA é que irá determinar qual será o tipo de doença que a pessoa poderá ter. Esta doença pode ser uma doença leve ou mais grave que possui tratamento e cura, ou pode ser uma doença mais grave que tem tratamento, mas não tem cura. Ou ainda, uma doença mais grave para a qual não existe tratamento ou cura. Além disso, podem existir alterações no DNA que não estão associadas à doença nenhuma, mas que podem ser identificadas por meio deste exame.

Assim, existem diferentes possíveis riscos associados à participação na pesquisa e relacionados às alterações identificadas no DNA, desde reconhecimento do risco de doenças previamente não identificadas quanto alterações genéticas que não se sabe quais são as repercussões. Caso você tenha interesse em receber as informações genéticas, nós iremos oferecer aconselhamento genético para melhor esclarecimento das repercussões das alterações no DNA na saúde da criança e familiares. Caso uma variante de risco seja identificada, nós encaminharemos a criança para consultas e atendimento especializado.

Em relação aos outros potenciais riscos e desconfortos associados com a participação nesta pesquisa, podemos citar a quebra acidental do anonimato dos dados do participante da pesquisa, entretanto, os pesquisadores responsáveis por esta pesquisa e sua equipe se comprometem em garantir a integridade e não violação dos documentos com informações dos pacientes, bem como assegurar a confidencialidade de todos os dados coletados do participante e seu responsável, apresentando os resultados sem identificação dos indivíduos.

A participação na pesquisa pode não trazer nenhum benefício direto ao participante, mas ainda assim o estudo poderá trazer benefícios indiretos, uma vez que auxiliará no melhor entendimento de como o Zika vírus causa as malformações e alterações observadas nos bebês expostos ao vírus. A pesquisa pode também trazer benefício direto ao participante se for identificada um risco genético de doenças; neste caso, o participante poderá ser encaminhado para acompanhamento médico especializado. Você também poderá mudar de ideia em receber ou não as informações genéticas em qualquer momento da pesquisa.

A fim de proteger os participantes da pesquisa e seus responsáveis contra qualquer tipo de discriminação ou estigmatização salientamos que todas as informações pessoais (inclusive fotografias, caso estejam disponíveis) ou relacionadas à saúde do paciente serão mantidas sob confidencialidade, não sendo de forma alguma divulgadas pela equipe desta pesquisa.

A participação na pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, não é obrigatória. Caso você decida não autorizar a participação, ou ainda, retirar a autorização após a assinatura desse Termo, não haverá nenhum prejuízo ao atendimento que o participante da pesquisa recebe ou possa vir a receber em qualquer instituição vinculada ao estudo. Além disso, caso você deseje retirar a autorização sobre a nossa guarda dos dados genéticos do participante, os quais serão

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 2 de 4

armazenados em bancos de dados, você deverá solicitar tal retirada por escrito e assinar. Essa solicitação pode ser feita a qualquer tempo, sem prejuízo ao participante da pesquisa, com validade a partir da data de comunicação da decisão. Neste caso, todas as amostras biológicas (exemplo: sangue do paciente) serão devolvidas a você ou destruídas, caso prefira.

Não está previsto nenhum tipo de pagamento pela participação na pesquisa e não haverá nenhum custo com respeito aos procedimentos envolvidos, todas as eventuais despesas tidas com a pesquisa serão de responsabilidade do pesquisador responsável ou patrocinador, isto é, o participante da pesquisa e seu acompanhante não arcarão com nenhum custo referente a procedimentos e/ou exames do estudo.

Caso ocorra alguma intercorrência ou dano, resultante da pesquisa, o participante receberá todo o atendimento necessário, sem nenhum custo pessoal. O participante tem o direito à indenização em caso de dano decorrente da participação na pesquisa.

Os dados coletados durante a pesquisa serão sempre tratados confidencialmente. Os resultados serão apresentados de forma conjunta, sem a identificação dos participantes, ou seja, os nomes não aparecerão na publicação dos resultados.

Caso você tenha dúvidas, poderá entrar em contato com a pesquisadora responsável Dra. Fernanda Sales Luiz Vianna pelo telefone 51-33598008 ou com a pesquisadora Dra. Lavínia Schüller-Faccini pelo telefone 51-33089826. Você também pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP). O CEP é um colegiado interdisciplinar e independente, de relevância pública, de caráter consultivo, deliberativo e educativo, criado para defender os interesses dos participantes da pesquisa em sua integridade e dignidade e para contribuir no desenvolvimento da pesquisa dentro de padrões éticos. O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) pode ser contatado pelo telefone (51) 33597640 de segunda à sexta, das 8h às 17h; ou pelo e-mail cep@hcpa.edu.br; ou no 2º andar do HCPA, Rua Ramiro Barcelos 2.350, sala 2229, Bairro Santa Cecília - CEP: 90035-903, Porto Alegre - RS. Você também poderá entrar em contato com a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP), que é uma instância colegiada, de natureza consultiva, deliberativa, normativa, educativa e independente, vinculada ao Conselho Nacional de Saúde/MS. A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa pode ser contatado pelo telefone (61) 3315-5877, ou no endereço: CONEP SRTV 701, Via W 5 Norte - Edifício PO 700, 3º andar – Asa Norte - CEP: 70719-000, Brasília-DF.

Após a realização das análises previstas neste projeto, as informações genéticas do participante ficarão armazenadas de forma codificada e somente os pesquisadores terão acesso a essas informações. Estas informações, além de serem utilizadas neste estudo, poderão ser utilizadas em outros estudos futuros do nosso grupo. Neste caso, um novo projeto de pesquisa será submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa e você poderá ser chamado para reconseguir com o uso das informações.

Com relação às amostras biológicas armazenadas

- () Autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.
- () Não autorizo o armazenamento do material biológico para pesquisas futuras.

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 3 de 4

Com relação aos resultados da análise genética:

- () Não quero ter acesso a nenhuma informação genética.
- () Quero ser informado caso seja encontrada alguma variante no DNA da criança que já foi associada a doenças que se manifestam antes dos 18 anos de idade e que possuem tratamento;
- () Quero que a informação sobre alguma variante no DNA da criança que já foi associada a doenças que se manifestam após os 18 anos, ou seja, na idade adulta, e possuem tratamento, seja armazenada e disponibilizada ao indivíduo (atualmente criança) depois que complete maioridade, caso ele deseje;
- () Quero que a informação sobre qualquer variante de risco, independente do efeito, ou seja, incluindo variantes associadas a doenças sem tratamento e/ou cura seja armazenada e disponibilizada ao indivíduo (atualmente criança) depois que complete maioridade, caso ele deseje.

Esse Termo é assinado em duas vias, sendo uma para o participante e seu responsável e outra para os pesquisadores.

Nome do participante da pesquisa:

Nome do responsável

Assinatura

Nome do pesquisador que aplicou o Termo

Assinatura

Local e Data: _____

Rubrica do responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Página 4 de 4

Questionário 1:
CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DA EMBRIOPATIA POR ZIKA VÍRUS/ZIKA CONGÊNITA
ROTEIRO DE EXAME CLÍNICO-DISMORFOLÓGICO E NEUROLÓGICO + PROTOCOLO DE EXAMES

Identificação do Caso – Número _____ – CARTÃO SUS:

Nome do RN/Paciente:					
Data de Nascimento:			Hora:		
Local de Nascimento (Cidade/UF):					
Nome da Mãe:			Idade: Mãe _____ anos / Pai _____ anos		
Endereço:					
Local de Moradia (Cidade/UF):			CEP:		
Telefone: () _____			Email:		
Serviço de atendimento para aplicação do Protocolo / Nº Prontuário:					
Data de atendimento:			Médico Examinador:		
História Familiar					
Consanguinidade 01. Sim (grau) 02. Não 03. Indefinida _____	Malformações 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinida Quem: O quê/onde:	Microcefalia 01. Sim (quem) 02. Não 03. Indefinida Quem:	Doenças Genéticas 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinida Quem/quais:	Abortos 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinida _____	Morte Neo/Precoce 01. Sim (quê/onde) 02. Não 03. Indefinido _____
História Perinatal					
Mãe: G _____ P _____ A _____		DUM:		Idade Gestacional ao nascer (semanas/dias):	
Para cada gestação > Idade, sexo, saúde:					
Dados de Pré-Natal (número de consultas, local, alterações, exames etc.):					
Medicações, Vitaminas, Ferro, Folato etc., se houve (qual, quando, por quê, etc):					
Sorologias na gestação:					
Ultrassonografias na gestação:					
Diagnósticos no Pré-Natal, se houve:					
Contato com teratógenos [se houve]					
Álcool 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinido O quê/quanto/quando:	Drogas 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinido O quê/quanto/quando:	Tabaco/Fumo 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinido O quê/quanto/quando:	Agrotóxicos 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinido O quê/quanto/quando:	Químicos/Poluentes 01. Sim (quê, quando) 02. Não 03. Indefinido O quê/quanto/quando:	Radiação (Ocupacional, Exame ou Acidente) 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinido O quê/quanto/quando:
Gravidez, Parto e Puerpério					
Febre 01. Sim (descrever) 02. Não 03. Indefinida _____	Rash/Exantema 01. Sim (quê, quando) 02. Não 03. Indefinido _____	Prurido 01. Sim (quê, quando) 02. Não 03. Indefinida _____	Hiperemia conjuntival 01. Sim (quando) 02. Não 03. Indefinido _____	Artralgia 01. Sim (quê, quando) 02. Não 03. Indefinida _____	Infecções na gravidez 01. Sim (quê, quando) 02. Não 03. Indefinida _____
Mãe vacinada para febre amarela: 01. Sim (quando) 02. Não 03. Indefinido _____	Mãe teve na gravidez: 01. Dengue 02. Chikungunya 03. Febre amarela 04. Outra Arbovirose: _____	Bebê mexeu no útero: 01. Antes dos 5m 02. Após 5m 03. Pouco 04. _____	Parto – Tipo: 01. Normal 02. Cesárea 03. Fórceps _____	Apgar: 1': _____ 5': _____ Outros: _____	Destino: 01. Alojamento 02. Berçário 03. UTI _____
Antropometria ao nascer (24 a 48h DE VIDA)					
Idade Gestacional: ____ s _____ percentil: _____	Ao nascer: Peso: _____ g percentil: _____	Estatura (cm): _____ percentil: _____	Perímetro cefálico (cm): _____ percentil: _____	Perímetro torácico (cm): _____ Relação PC/PT: _____	Comprimento Vértice-Cóccix: _____ Relação PC/VC: _____

ATENÇÃO: Anexar a esta ficha o TCLE, Heredograma, Documentação Fotográfica, Vídeos e Exames

CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DA EMBRIOPATIA POR ZIKA – FORMULÁRIO DE RASTREAMENTO

Nome do RN/Paciente: _____		Serviço/Prontuário: _____				
Data de Nascimento: _____		Identificação do Caso – Número _____				
Nome da Mãe: _____		Identificação do Caso – Número _____				
Antropometria no exame físico dismorfológico posterior ao nascimento						
Exame físico em: Data _____/_____/_____ Idade atual: _____	Peso: _____ g Percentil: _____	Estatura (cm): [][] [][] [][] Percentil: _____	Perímetro cefálico (cm): [][] [][] [][] Percentil: _____ Microcefalia: () Sim / () Não			
			PC Pai: _____ cm Percentil: _____ PC Mãe: _____ cm Percentil: _____			
			Perímetro torácico (cm): [][] [][] [][] Percentil: _____			
Exames Clínicos	Variáveis	Data	Data	Data	Data	
Dismorfológicos	1	PC em centímetros (z score)				
	2	Desproporção craniofacial				
	3	Fronte estreita com depressão frontal bilateral				
	4	Retração bitemporal				
	5	Posterior <i>slooping</i> do frontal				
	6	Ponta Occipital				
	7	Ponta Temporal/Temporais proeminentes				
	8	Suturas palpáveis ou cavalgadas				
	9	Excesso de pele em couro cabeludo				
	10	Excesso de pele fronte				
	11	Excesso de pele em nuca				
	12	Pescoço curto				
	13	Padrão anormal de desenvolvimento do cabelo				
	14	<i>Upsweep</i> frontal do cabelo				
	15	Redemoinho: número _____ / posição _____				
	16	Outro: _____				
	17	Implantação de cabelo na fronte: () normal / () baixa / () alta				
	18	Implantação de cabelo na nuca: () normal / () baixa / () alta				
	19	Pálpebras superiores com aspecto edemaciado				
	20	Epicanto				
	21	Sinofre				
	22	Cílios longos				
	23	Estrabismo				
	24	Nistagmo				
	25	Ptose palpebral				
	26	Microftalmia				
	27	Filtro longo/apagado				
	28	Lábio superior fino				
	29	Ausência de frênulo lingual				
	30	Hipertrofia alveolar				
	31	Retrognatia				
	32	Nevus (vasculares) em face				
	33	Excesso de pele em dorso				
	34	Fóveas: () punho/ () cotovelo/ () ombro/ () quadril/ () joelho				
	35	Mãos com contratura				
	36	Camptodactilia				
	37	Polegar cortical				
	38	<i>Index</i> cortical				
	39	Pregas palmares profundas				
	40	“Pads” () dedos das mãos/ () dedos dos pés				
	41	Pés tortos:				
	42	Artrogripose: () distal / () generalizada				
	43	Pterigium				
	44	Hérnia umbilical				
	45	Outros dismorfismos:				

Outros

TORCHS Negativo

Infeção por Zika: () IgM / () IgG () PCR / Mãe: () IgM / () IgG () Mãe grávida PCR () _____

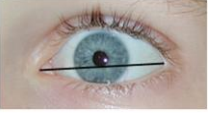



CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DA EMBRIOPIATIA POR ZIKA – FORMULÁRIO DE RASTREAMENTO

Nome do RN/Paciente: _____	
Data de Nascimento: _____	Serviço/Prontuário: _____
Nome da Mãe: _____	Identificação do Caso – Número _____

AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA

Exames Clínicos	Variáveis	Sim	Não	Não observado
Neurosensoriais	46 Fixa o olhar/ acompanha ao examinador			
	47 Responde a sons			
	48 Alteração de Fundoscopia/Oftalmológica/Visão			
	49 Alteração auditiva (EOA, BERA etc)			
	50 Outros:			

Olhos – Exame realizado por () Dismorfologista / () Oftalmologista

Fissura palpebral (cm) 	Fissura palpebral (cm): OD: _____ cm Percentil: _____ OE: _____ cm Percentil: _____	Inspeção 01. Normal 02. Microftalmia 03. Exoftalmia 04. Assimetria _____	Motricidade ocular 01. Normal 02. Nistagmo _____ 03. Estrabismo _____	Distância Intercantal Externa (cm):  Percentil: _____	Distância Intercantal Interna (cm):  Percentil: _____
Sobrancelhas 01. Normais 02. Ausentes 03. Espessas 04. Sinofre 05. Medial Ascendente	Pálpebra 01. Normal 02. Ptose 03. Epicanto 04. Telecanto 05. _____	Conjuntivas 01. Normal AO 02. Alterado OD 03. Alterado OE _____	Esclera 01. Normal AO 02. Alterado OD 03. Alterado OE _____	Córnea 01. Normal AO 02. Alterado OD 03. Alterado OE _____	Íris 01. Normal AO 02. Alterado OD 03. Alterado OE _____
Pupilas 01. Normal 02. Anisocoria 03. Outra (descrever) _____	Reflexo Pupilar/ Fomotor 01. Normal/Simétrico 02. Alterado (descrever) _____	Distância Interpupilar (cm):  Percentil: _____	Alteração de distância interpupilar 01. Não 02. Hipotelorismo 03. Hipertelorismo 04. Indefinida	Teste do Olhinho/ Reflexo Vermelho 01. Presente AO 02. Ausente OD 03. Ausente OE 04. Ausente AO	Catarata 01. Não 02. Sim, OD 03. Sim OE 04. Sim, AO _____
Fundoscopia OD Retina 01. Normal 02. Alterada 03. Não realizada	Fundoscopia OD Nervo Óptico 01. Normal 02. Pálido 03. Atrofiado 04. Não realizada	Fundoscopia OE Retina 01. Normal 02. Alterada 03. Não realizada	Fundoscopia OE Nervo Óptico 01. Normal 02. Pálido 03. Atrofiado 04. Não realizada	Outros achados: Se realizou Mapeamento de Retina, descrever na página 6.	Observação: Se exame feito por Dismorfologista, pedir Avaliação Oftalmológica (pág. 6).

OUTROS EXAMES (RN)	REALIZADO	DATA DO EXAME	RESULTADO
AVALIAÇÃO OFTALMOLÓGICA	01.Sim 02.Não 03.Inaplicável	___/___/___	01. Normal Bilateral 02. Alterada OD: _____ OE: _____
MAPEAMENTO DE RETINA	01.Sim 02.Não 03.Inaplicável	___/___/___	01. Normal Bilateral 02. Alterada OD: _____ OE: _____
TESTE DA ORELHINHA (EOA)	01.Sim 02.Não 03.Inaplicável	___/___/___	01. Normal 02. Alterada Se alterada, especifique: _____
BERA	01.Sim 02.Não 03.Inaplicável	___/___/___	01. Normal 02. Alterada Se alterada, especifique: _____

CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DA EMBRIOPATIA POR ZIKA – FORMULÁRIO DE RASTREAMENTO

Nome do RN/Paciente:		Serviço/Prontuário:		
Data de Nascimento:		Identificação do Caso – Número		
Nome da Mãe:				
Roteiro de Exame Neurológico (Gherpelli, RevMed SP 2003)				
Impressão Geral, Contato, Movimentação, Tono				
Estado Comportamental durante o Exame 01. Sono quieto 02. Sono ativo 03. Despertar quieto 04. Despertar ativo 05. Choro	Padrão geral de comportamento 01. Adequado 02. Apático 03. Irritado	Choro 01. Normal (com timbre variável, responde a dor) 02. Monótono ou agudo 03. Forte e irritado 04. Entrecortado 05. Outro:	Irritabilidade 01. Normal 02. Diminuída 03. Aumentada (Hiperexcitável)	
Postura 01. Normal 02. MMII em Tesoura 03. Opistótono 04. _____	Tônus 01. Normal 02. Hipotonia 03. Hipertonia Espástica 04. Hipertonia Distônica	Equilíbrio (até 4º mês)/ Sustensão Cefálica 01. Apresenta 02. Não apresenta	Equilíbrio à Marcha (se o lactente já anda) 01. Ainda não anda 02. Marcha normal 03. Marcha atáxica 04. Outra:	
Paralisia (onde) 01. Não 02. Sim	Atividade ou Movimentação Espontânea 01. Ativo 02. Hipoativo 03. Hiperativo ou Agitado	Reatividade ou Movimentação Provocada 01. Reativo 02. Hiporreativo 03. Hiperreativo ou Hiperexcitável	Movimentos Anormais 01. Mastigatórios 02. Tremores 03. Mioclonias 04. Distonias 05. Coréia 06. Balismo	
Reflexos Primitivos – Do Moro à Marcha são obrigatórios (0 para Ausente ou Arreflexia, 1 Diminuído/alteração tônica sem evidenciar a postura do reflexo, 2 Normal/postura apropriada do reflexo, 3 Vivo/resposta mais exagerada que o normal/postura pronunciada e com tempo prolongado do reflexo, 4 Exaltado ou Hiperreflexia/resposta obrigatória impossibilitando inibir o reflexo por um mínimo de 30 segundos/patológico)				
Moro:	Sucção:	Voracidade:	RTCA:	
Preensão Palmar:	Babkin:	Gallant:	Preensão Plantar:	
Outros (se aplicáveis)	RTL Prono:	RTL Supino:	Endireitamento Global (>2m):	
Reflexos Profundos ou ROT (0 para Ausente ou Arreflexia, 1 Diminuído, 2 Normal, 3 Vivo, 4 Exaltado ou Hiperreflexia)				
Lado Direito	Bicipital:	Estilorradial:	Patelar:	
Lado Esquerdo	Bicipital:	Estilorradial:	Patelar:	
Nervos Cranianos (Manobras/Respostas) – Obs.: Nervos Craniano I (N. Olfatório) – Não avaliado.				
II [N. Óptico à Fundoscopia] 01. Normal Bilateral 02. Alterado (D) / (E) 03. Alterado Bilateral 04. _____	II, III Fotorreação pupilar 01. Normal 02. Alterada	III, IV, VI Mov. Extraoculares 01. Normais 02. Alterados	V Reflexo corneano 01. Normal 02. Alterado	
VIII Piscar ao som/ruído alto 01. Normal 02. Alterado	V, VII, XII Sugar 01. Normal 02. Alterado	IX, X, XII Deglutir 01. Normal 02. Alterado 03. Disfagia/Engasgo	IX, X Vomitir 01. Normal 02. Alterado	
Exames Clínicos		Variáveis		
Neurológicos	Hipoatividade motora	Sim	Não	Não observado
	Hipertonia/opistótono			
	Hiperreflexia/clous			
	Mão fechada/Polegar cortical			
	Hipotonia axial ao sentar depois do 6º mês			
	Irritabilidade/hiperexcitabilidade			
	Choro excessivo/entrecortado			
	Inconsolabilidade			
Neurosensoriais	Pouco alerta / Pouco contato com examinador			
	Atraso de desenvolvimento neuropsicomotor significativo (-2m Crono)			
	Fixa o olhar/ acampanha ao examinador			
	Responde a sons			
Neuroimagem	Alteração de Fundoscopia/Oftalmológica/Visão			
	Alteração auditiva (EOA, BERA etc)			
	Calcificação			
	Padrão giral simplificado			
	Dismorfismo ou assimetria ventricular			
	Excesso de Líquor ventricular (dilatação) / Excesso de Líquorextra-axial			
Outros	Alteração do corpo caloso			
	Alteração do cerebelo			
	Alteração de Substância Branca			
TORCHS Negativo				
Infecção por Zika: () IgM / () PCR // () Mãe grávida () RN				

CARACTERIZAÇÃO DO FENÓTIPO DA EMBRIOPATIA POR ZIKA – FORMULÁRIO DE RASTREAMENTO

Nome do RN/Paciente:	
Data de Nascimento:	Serviço/Prontuário:
Nome da Mãe:	Identificação do Caso – Número _____

EXAMES COMPLEMENTARES DO RN

EXAMES IMAGEM (RN)	REALIZADA	DATA DO EXAME	RESULTADO
USG TRANSFONTANELA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Padrão giral simplificado 03. Calcificações 04. Atrofia cerebral 05. Ventriculomegalia 06. Calcificação de suturas cranianas 07. Outras _____ 08. Sem informação
TOMOGRÁFIA CRANIANA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Padrão giral simplificado 03. Calcificações 04. Atrofia cerebral 05. Ventriculomegalia 06. Calcificação de suturas cranianas 07. Outras _____ 08. Sem informação
RESSONÂNCIA MAGNÉTICA CRANIANA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Padrão giral simplificado 03. Calcificações 04. Atrofia cerebral 05. Ventriculomegalia 06. Calcificação de suturas cranianas 07. Outras _____ 08. Sem informação
USG ABDOMINAL	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Alterada Se alterada, especifique: _____ Se medida disponível: Baço – tamanho longitudinal: _____ cm
ECOCARDIOGRAMA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Alterada Se alterada, especifique: _____
OUTROS EXAMES (RN)	REALIZADO	DATA DO EXAME	RESULTADO
AValiação OFTALMOLÓGICA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal Bilateral 02. Alterada OD: _____ OE: _____
MAPEAMENTO DE RETINA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal Bilateral 02. Alterada OD: _____ OE: _____
TESTE DA ORELHINHA (EOA)	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Alterada Se alterada, especifique: _____
BERA	01. Sim 02. Não 03. Inaplicável	_ / _ / _	01. Normal 02. Alterada Se alterada, especifique: _____

Questionário 2:

Nome do responsável:
Nome do RN/paciente:
Data da entrevista: ___ / ___ / ___
Entrevistador (a):
Telefone fixo: () Celular: ()
E-mail:
DADOS GERAIS
Cor ou etnia Declarada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena Observada (1) branca (2) preta (3) amarela (4) parda (5) indígena
Qual seu grau de escolaridade? () não alfabetizado () ensino fundamental incompleto () ensino fundamental completo () ensino médio incompleto () ensino médio completo () ensino superior incompleto () ensino superior completo
Qual é a sua profissão?
Qual é a sua ocupação?
Quantas pessoas moram com você? (incluindo filhos, irmãos, parentes, amigos, etc)
Somando a sua renda com a renda das pessoas que moram com você, quanto é, aproximadamente, a renda familiar mensal? () Até 1 salário mínimo (até R\$937,00) () De 1 a 3 salários mínimos (R\$937,00 até R\$2811,00) () De 3 a 6 salários mínimos (R\$2811,00 até R\$5622,00) () De 6 a 9 salários mínimos (R\$5622,00 até R\$8433,00) () De 9 a 12 salários mínimos (R\$8433,00 até R\$11244,00) () Mais de 12 salários mínimos (mais de R\$11244,00)

Produção científica adicional durante o doutorado

PROTOCOL

Open Access

Molecular mechanisms of Zika virus teratogenesis from animal studies: a systematic review protocol



Gabriela Elis Wachholz^{1,2,3†}, Julia do Amaral Gomes^{1,2,3†}, Juliano André Boquett^{1,4}, Fernanda Sales Luiz Vianna^{1,2,3,5}, Lavínia Schuler-Faccini^{1,2,4} and Lucas Rosa Fraga^{2,3,5,6*} 

Abstract

Background: Due to the diversity of studies in animal models reporting that molecular mechanisms are involved in the teratogenic effect of the Zika virus (ZIKV), the objective of the present study is to evaluate the methodological quality of these studies, as well as to demonstrate which genes and which molecular pathways are affected by ZIKV in different animal models.

Methods: This search will be performed in four databases: PubMed/MEDLINE, EMBASE, Web of Science, and Scopus, as well as in the grey literature. The studies selection process will be reported through the *PRISMA Statement* diagram model. All studies describing the molecular mechanisms possibly involved in the development of malformations caused by embryonic/fetal ZIKV exposure in animal models with an appropriate control group and methodology will be included (including, for instance, randomized and non-randomized studies). All animals used as experimental models for ZIKV teratogenesis may be included as long as exposure to the virus occurred during the embryonic/fetal period. From the selected studies, data will be extracted using a previously prepared standard form. Bias risk evaluation will be conducted following the *SYRCLE's Risk of Bias* tool. All data obtained will be tabulated and organized by outcomes (morphological and molecular).

Discussion: With the proposed systematic review, we expect to present results about the methodological quality of the published studies with animal models that investigated the molecular mechanisms involved in the teratogenic effect of ZIKV, as well as to show the studies with greater reliability.

Systematic review registration: PROSPERO [CRD42019157316](https://www.crd.york.ac.uk/PROSPERO/record/CRD42019157316)

Keywords: Gene expression, Epigenetics, Experimental models, Microcephaly, CNS birth defects, Infection

* Correspondence: lfraga@ufrgs.br

[†]Gabriela Elis Wachholz and Julia do Amaral Gomes contributed equally to this work.

²Teratology Information Service, Medical Genetics Service, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil

³Laboratory of Genomic Medicine, Experimental Research Center, Hospital de Clínicas de Porto Alegre, Porto Alegre 90035-903, Brazil

Full list of author information is available at the end of the article



© The Author(s). 2021 **Open Access** This article is licensed under a Creative Commons Attribution 4.0 International License, which permits use, sharing, adaptation, distribution and reproduction in any medium or format, as long as you give appropriate credit to the original author(s) and the source, provide a link to the Creative Commons licence, and indicate if changes were made. The images or other third party material in this article are included in the article's Creative Commons licence, unless indicated otherwise in a credit line to the material. If material is not included in the article's Creative Commons licence and your intended use is not permitted by statutory regulation or exceeds the permitted use, you will need to obtain permission directly from the copyright holder. To view a copy of this licence, visit <http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>. The Creative Commons Public Domain Dedication waiver (<http://creativecommons.org/publicdomain/zero/1.0/>) applies to the data made available in this article, unless otherwise stated in a credit line to the data.