

Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo

**LUCILA AKUNE BARREIROS**

**Fatores genéticos e imunológicos relacionados a Síndrome  
Congênita do Zika em humanos**

São Paulo  
2023

LUCILA AKUNE BARREIROS

**Fatores genéticos e imunológicos relacionados a Síndrome  
Congênita do Zika em humanos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo para obtenção de título de Doutor em Ciências na área de Imunologia.

Versão original.

Orientador: Prof. Dr. Antonio Condino Neto

Coorientador: Prof. Dr. Paulo Vítor Soeiro Pereira

Departamento de Imunologia  
Instituto de Ciências Biomédicas  
Universidade de São Paulo

2023

CATALOGAÇÃO NA PUBLICAÇÃO (CIP)

Serviço de Biblioteca e informação Biomédica  
do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo  
Ficha Catalográfica elaborada pela autora

Barreiros, Lucila Akune

Fatores genéticos e imunológicos relacionados a Síndrome Congênita do Zika em humanos / Lucila Akune Barreiros; orientador Antonio Condino-Neto; coorientador Paulo Vitor Soeiro Pereira. -- São Paulo, 2023.

109 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Zika virus. 2. Síndrome Congênita do Zika. 3. Imunogenética. 4. Erros inatos da imunidade. 5. autoanticorpos . I. Condino-Neto, Antonio, orientador. II. Pereira, Paulo Vitor Soeiro, coorientador. III. Título.

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

---

Candidata: **Lucila Akune Barreiros**

Título da Tese: **Fatores genéticos e imunológicos relacionados a Síndrome Congênita do Zika em humanos**

Orientador: **Antonio Condino Neto**

Coorientador: **Paulo Vítor Soeiro Pereira**

A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa da Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada a ...../...../ **2023**, considerou a candidata:

(  ) **Aprovada**

(  ) **Reprovada**

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Examinador(a):                      Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

Presidente:                              Assinatura: .....  
Nome: .....  
Instituição: .....

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos que contribuíram com este trabalho, na forma de apoio científico, acadêmico e emocional.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas e ao Departamento de Imunologia pelos recursos investidos. A todos os professores e professoras que despertaram cada vez mais meu interesse pela imunologia e a ciência de maneira geral.

Ao meu orientador, Antonio Condino Neto, por ter me incluído no Laboratório de Imunologia Humana (LIH) e proporcionado experiências acadêmicas e científicas únicas. E ao meu coorientador, Paulo Vítor, por ter me acolhido e contribuído para o meu crescimento científico desde os meus primeiros passos na vida acadêmica e por ter possibilitado a inclusão de crianças e mulheres expostas ao Zika vírus. Nesse sentido, agradeço também ao grupo da Faculdade de Medicina de Jundiaí, na figura do Dr. Saulo Passos, e ao grupo da Profa. Dra. Mayana Zatz e do Prof. Dr. Michel Naslavsky.

Ao professor Jean Laurent Casanova e toda a equipe de seus laboratórios, na Universidade de Rockefeller em Nova Iorque e no INSERM em Paris. O auxílio destes grupos foi indispensável para o desenvolvimento deste projeto.

À toda equipe do LIH, por todo apoio intelectual e emocional. Os cafés, almoços, lanchinhos e congressos com meus pares são em grande parte, responsáveis pelo meu crescimento científico e pessoal. Agradeço especialmente à Christina Arslanian Kubo, Marília Kanegae e Tábata Takahashi França pela divisão das tarefas, dos pesos e das conquistas, e o eventual puxão de orelha. Sem vocês minha trajetória jamais seria a mesma.

Aos meus amigos, formados por grupos diversos e improváveis, mas que juntos tornam o caminho muito mais divertido e leve.

À minha família, em especial aos meus pais, Elizabete e Hélio, por me proporcionarem diariamente exemplos de empatia, compromisso e persistência, e por terem me dado total liberdade e apoio para minhas escolhas e decisões.

À Marlene e Amanda, por terem me acolhido em suas vidas e casa durante a pandemia, como se eu sempre tivesse estado lá.

Agradeço ao Victor Giovannetti, pelo companheirismo, apoio, abraços e palavras que fazem com que eu acredite que tudo é possível.

Finalmente, agradeço a todos os pacientes e suas famílias.

Esse trabalho é dedicado a todos vocês.

## **AGRADECIMENTOS ESPECIAIS**

Agradeço especialmente a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), processo número 2018/09407-0, pela bolsa de doutorado e auxílio concedido e sem o qual não teria sido possível a realização do presente trabalho. Além disso, afirmo que as opiniões, hipóteses e conclusões ou recomendações expressas neste material são de responsabilidade da autora e não necessariamente refletem a visão da FAPESP.

Da mesma maneira, agradeço à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal Nível Superior (CAPES) pelo apoio concedido no formato do Programa Institucional de Internacionalização (CAPES-PRInt, modalidade CAP, processo número 88887.370752/2019-00) que possibilitou realização de breve estágio no exterior na Universidade de Rockefeller para capacitação da aluna, facilitando o desenvolvimento da presente tese.

## EPÍGRAFE

*“Science works on the frontier between knowledge and ignorance. We are not afraid to admit what we don’t know. There’s no shame in that. The only shame is to pretend that we have all the answers.”*

“A ciência trabalha na fronteira entre o conhecimento e a ignorância. Não temos medo de admitir o que não sabemos. Não há vergonha nisso. A única vergonha é fingir que temos todas as respostas.”

**Neil Degrasse Tyson**

## RESUMO

### **Barreiros LA. Fatores genéticos e imunológicos relacionados a Síndrome Congênita do Zika em humanos**

O zika vírus é um flavivírus que reemergiu nas Américas em 2015 e se tornou um problema de saúde pública internacional. O aumento na prevalência de infecções pelo zika no Brasil coincidiu com o aumento da ocorrência de casos de microcefalia e outras complicações neurológicas em neonatos, cunhando a Síndrome Congênita do Zika. Apesar da gravidade de certos casos, acredita-se que apenas 20% dos infectados manifestem quaisquer sintomas da doença, adicionando-se a isso amplo espectro clínico. Estudos com modelos animais mostraram que apenas linhagens com deficiências em componentes da via de interferon do tipo I são susceptíveis aos danos neurológicos congênitos. Isso, somado a estudos com gêmeos dizigóticos com fenótipos discordantes para a síndrome, sugerem que fatores genéticos da imunidade inata do hospedeiro podem ter papel determinante no curso da infecção e do estabelecimento da síndrome. Sendo assim, o presente estudo visou investigar os mecanismos genéticos do desenvolvimento da Síndrome Congênita do Zika em humanos, com especial foco na resposta imunológica antiviral. Para isso, foram incluídas no estudo mulheres infectadas pelo vírus durante a gestação e também os respectivos filhos, com desenvolvimento normal ou com a Síndrome Congênita do Zika. A investigação genética iniciou através do sequenciamento completo de exoma de 75 indivíduos, divididos em dois grupos: um composto por 20 mães expostas e 21 crianças afetadas e o segundo composto por 14 mães expostas e 20 crianças saudáveis. Foram selecionadas para análise primária variantes raras e com predição de patogenicidade por ferramentas *in silico* em genes associados aos erros inatos da imunidade. Adicionalmente, foi realizada análise exploratória de associação de variantes comuns e raras ao fenótipo da SCZ em quaisquer genes. Não houve evidência para apontar mecanismo causal, contudo foram identificadas variantes em genes que levam a fenótipos sindrômicos associados a defeitos neurológicos (*KMT2A*, *KMT2D*, *RTEL1* e *NFE2L2*), em genes que codificam proteínas que interagem com componentes da imunidade antiviral (*RELA*, *TNFAIP3*) e genes associados ao fenótipo da síndrome congênita que são preferencialmente expressos no cérebro (*CNTNAP3*, *FOXD4L6*). Todos esses podem ser fatores genéticos modificadores que contribuem individualmente em pequena escala para a severidade do fenótipo dos indivíduos afetados e também pode indicar não há um único gene ou mecanismo capaz de levar à SCZ, mas sim, uma multiplicidade de fatores que podem contribuir para o desfecho final.

**Palavras-chave:** Zika vírus, Síndrome Congênita do Zika, Imunogenética, Erros inatos da imunidade, auto-anticorpos.



## ABSTRACT

Barreiros LA. **Genetic and immunologic factors related to Congenital Zika Syndrome in humans.**

Zika virus is a flavivirus that re-emerged in the Americas in 2015 and has become an international public health problem. The increase in the prevalence of Zika infections in Brazil coincided with the increase in the occurrence of cases of microcephaly and other neurological complications in neonates, coining the Congenital Zika Syndrome. Despite the severity of certain cases, it is believed that only 20% of those infected children, manifest any symptoms of the disease, which presents with a broad clinical spectrum. Studies with animal models have shown that only strains with deficiencies in components of the type I interferon pathway are susceptible to congenital neurological damage. This, added to studies with dizygotic twins with discordant phenotypes for the syndrome, suggest that genetic factors of the host's innate immunity may play a decisive role in the course of the infection and the establishment of the syndrome. Therefore, the present study aimed to investigate the genetic mechanisms of the development of Congenital Zika Syndrome in humans, with special focus on the antiviral immune response. For this purpose, women infected by the virus during pregnancy and their children, with normal development or with Congenital Zika Syndrome, were included in the study. The genetic investigation started with the whole exome sequencing of 75 individuals, divided into two groups: one composed of 20 exposed mothers and 21 affected children and the second composed of 14 exposed mothers and 20 healthy children. Rare variants with prediction of pathogenicity by *in silico* tools in genes associated with inborn errors of immunity were selected for the primary analysis. Additionally, an exploratory analysis of the association of common and rare variants with the SCZ phenotype was performed, encompassing the whole exome. There was no evidence to pinpoint a causal mechanism, however variants were identified in genes that lead to syndromic phenotypes associated with neurological defects (*KMT2A*, *KMT2D*, *RTEL1* and *NFE2L2*), genes that encode proteins that interact with components of antiviral immunity (*RELA*, *TNFAIP3*) and genes associated with the congenital syndrome phenotype that are preferentially expressed in the brain (*CNTNAP3*, *FOXD4L6*). All of these may be genetic modifying factors that contribute individually on a small scale to the worsening of the phenotype of affected individuals and may also indicate that this is not a single gene or mechanism leading to SCZ, but a multiplicity of factors that may contribute to the final outcome.

**Keywords:** Zika virus, Congenital Zika Syndrome, Immunogenetics, Inborn errors of immunity, autoantibodies.

## LISTRA DE ILUSTRAÇÕES

<b>Figura 1.</b>	Distribuição geográfica do zika vírus até julho de 2019	<b>17</b>
<b>Figura 2.</b>	Casos de infecção pelo Zika vírus no Brasil	<b>18</b>
<b>Figura 3.</b>	Estrutura do ZIKV	<b>20</b>
<b>Figura 4.</b>	Resposta de IFN do hospedeiro e mecanismos de evasão do ZIKV	<b>29</b>
<b>Figura 5.</b>	Distribuição dos grupos incluídos no estudo	<b>37</b>
<b>Figura 6.</b>	Manifestações clínicas das mães expostas ao ZIKV durante a gestação	<b>51</b>
<b>Figura 7.</b>	Quantidade de sintomas relatados pelas mães infectadas pelo ZIKV durante a gestação	<b>51</b>
<b>Figura 8.</b>	Mês de gestação da manifestação de sintomas da infecção pelo ZIKV	<b>52</b>
<b>Figura 9.</b>	Porcentagem de sintomas relacionados à SCZ nas crianças afetadas	<b>55</b>
<b>Figura 10.</b>	Redes de interações proteicas dos genes com variantes provavelmente patogênicas identificadas nas crianças com SCZ	<b>65</b>
<b>Figura 11.</b>	Análise de componente principal do exoma dos indivíduos incluídos no estudo	<b>73</b>
<b>Figura 12.</b>	Análise de associação à Síndrome Congênita do Zika no grupo A	<b>74</b>
<b>Figura 13.</b>	Análise de associação à Síndrome Congênita do Zika no grupo B	<b>74</b>
<b>Figura 14.</b>	Comparação dos resultados obtidos pelos diferentes métodos de normalização da atividade da luciferase	<b>79</b>

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b>	Casos suspeitos de Síndrome Congênita do Zika reportados no Brasil entre março de 2015 e julho de 2022	<b>19</b>
<b>Tabela 2.</b>	Indivíduos incluídos no estudo	<b>44</b>
<b>Tabela 3.</b>	Caracterização do grupo de mães com as manifestações clínicas da infecção pelo ZIKV apresentadas durante a gestação	<b>48</b>
<b>Tabela 4.</b>	Caracterização do grupo completo de crianças incluídas no estudo	<b>53</b>
<b>Tabela 5.</b>	Caracterização clínica do grupo de crianças expostas ao Zika vírus e afetadas com a Síndrome Congênita do Zika	<b>56</b>
<b>Tabela 6.</b>	Variantes raras com predição de patogenicidade em genes dos Erros Inatos da Imunidade identificadas nas crianças afetadas pela Síndrome Congênita do Zika	<b>59</b>
<b>Tabela 7.</b>	Variantes raras e com predição de patogenicidade em genes dos Erros Inatos da Imunidade identificadas nas mães de crianças com Síndrome Congênita do Zika	<b>66</b>
<b>Tabela 8.</b>	Dados clínicos da coorte ZIKV da Prof <sup>a</sup> . Mayana Zatz do Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo	<b>70</b>
<b>Tabela 9.</b>	Variantes comuns associadas ao grupo de expostos afetados	<b>75</b>
<b>Tabela 10.</b>	Indução de luciferase após estimulação com IFN tipo I no grupo A	<b>80</b>
<b>Tabela 11.</b>	Indução de luciferase após estimulação com IFN tipo I no grupo B	<b>81</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AD – autossômico dominante  
ANOVA – análise de variância, do inglês, *analysis of variance*  
AR – autossômico recessivo  
Autoabs – autoanticorpos  
B – benigno  
C – proteína viral estrutural capsídeo  
CEGH – Centro de Estudos do Genoma Humano  
CNV – variações em número de cópia, do inglês, *Copy Number Variants*  
CPN – células precursoras neuronais  
DC – célula dendrítica; do inglês *Dendritic cell*  
Del – deleção  
DENV – vírus da dengue; do inglês *dengue virus*  
DN – data de nascimento  
DNA – ácido desoxirribonucleico; do inglês *deoxyribonucleic acid*  
DNAg – DNA genômico  
E – proteína viral estrutural envelope  
EA – grupo exposto afetado  
EBV – Epstein-Barr vírus  
EII – Erro Inato da Imunidade  
ES – grupo exposto saudável  
F – feminino  
FA – frequência alélica  
FFM – febre familiar do mediterrâneo  
GWAS – *Genome-wide associations study*, do inglês, estudos de associação genômica  
HSV – herpes simplex vírus  
HVAR – *Human Variation*  
IB-USP – Instituto de Biociências da Universidade de São Paulo  
IDP – imunodeficiência primária  
IFN – interferon  
Indel – inserção ou deleção  
IRFs – fatores reguladores de interferon, do inglês, *IFN regulatory factors*  
ISGs – genes estimulados por interferon, do inglês, *IFN stimulated genes*  
ISRE - *Interferon-sensitive response element*; do inglês elemento de resposta sensível a IFN  
ITU – infecção do trato urinário  
IUIS – *Internation Union of Immunological Societies*  
LHF – linfocitose hematofagocítica  
M – masculino  
MAF – do inglês, *Minor Allele Frequency*  
MT – Mutation Taster  
NE – grupo não exposto  
NGS – sequenciamento de nova geração; do inglês *Next Generation Sequencing*  
NI – não informado  
NS – proteínas não estruturais virais; do inglês *non-structural*  
OMS – Organização Mundial da Saúde

P – patogênico  
 PCR – reação em cadeia da polimerase, do inglês *polymerase chain reaction*  
 PNH – primata não humano  
 PP – provavelmente patogênico  
 PP2 – PolyPhen2  
 PPA – proteína precursora amiloide  
 PrM – proteína viral estrutural pré-membrana  
 PRNT – teste de neutralização por redução de placa, do inglês, *Plaque Reduction Neutralization test*  
 PRRs – receptores de reconhecimento de padrões; do inglês *Pattern Recognition Receptors*  
 RLRs – receptores do tipo RIG, do inglês, *RIG-I-like-receptors*  
 RNA – ácido ribonucléico; do inglês *ribonucleic acid*  
 SCZ – Síndrome Congênita do Zika  
 SGB – Síndrome de Guillain-Barré  
 SIFT – do inglês, *Sorting Tolerant From Intolerant*  
 SNC – Sistema Nervoso Central  
 SNV – variante individual de nucleotídeo, do inglês *Single Nucleotide Variant*  
 TAE – Tris-Acetato-EDTA  
 TLRs – receptores do tipo Toll, do inglês, *Toll-like receptors*  
 TORCH – Toxoplasmose, Rubéola, Citomegalovírus, Herpes simplex  
 UFMA – Universidade Federal do Maranhão  
 WES – do inglês *Whole Exome Sequencing*  
 WNV – vírus da febre do Nilo; do inglês *Western Nile virus*  
 XL – ligado ao X, do inglês, *X-linked*  
 YFV – vírus da febre amarela; do inglês *yellow fever virus*  
 ZIKV – Zika virus

### Aminoácidos

<b>Código (1 letra)</b>	<b>Código (3 letras)</b>	<b>Aminoácido</b>
A	Ala	Alanina
R	Arg	Arginina
N	Asn	Asparagina
D	Asp	Aspartato
C	Cys	Cisteína
Q	Gln	Glutamina
E	Glu	Ácido glutâmico
G	Gly	Glicina
H	His	Histidina
I	Ile	Isoleucina
L	Leu	Leucina
K	Lys	Lisina
M	Met	Metionina
F	Phe	Fenilalanina
P	Pro	Prolina
S	Ser	Serina
T	Thr	Treonina
W	Trp	Triptófano
Y	Tyr	Tirosina

**Bases nitrogenadas:** A – adenina, C – Citosina, G – Guanina, T – Timina.

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>15</b>
<b>1.1 Zika vírus</b>	<b>15</b>
<i>1.1.1 Etiologia e epidemiologia</i>	<b>15</b>
<i>1.1.2 Estrutura do ZIKV</i>	<b>19</b>
<i>1.1.3 Transmissão</i>	<b>21</b>
<i>1.1.4 Manifestações clínicas</i>	<b>22</b>
<i>1.1.5 Patogênese</i>	<b>23</b>
<i>1.1.5.1 Receptores de reconhecimento de padrões na infecção pelo ZIKV</i>	<b>25</b>
<i>1.1.5.2 Resposta antiviral de interferons</i>	<b>26</b>
<i>1.1.5.3 Imunidade adaptativa contra o Zika vírus</i>	<b>27</b>
<i>1.1.5.4 Mecanismos de evasão imune do Zika vírus</i>	<b>28</b>
<b>1.2 A teoria genética das doenças infecciosas e os erros inatos da imunidade</b>	<b>30</b>
<i>1.2.1 Susceptibilidade a infecções virais</i>	<b>31</b>
<b>2. JUSTIFICATIVA</b>	<b>33</b>
<b>3. OBJETIVOS</b>	<b>35</b>
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>36</b>
<b>4.1 Inclusão de indivíduos e amostras</b>	<b>36</b>
<b>4.2 Investigação genética</b>	<b>38</b>
<i>4.2.1 Extração de DNA</i>	<b>38</b>
<i>4.2.2 Sequenciamento completo de exoma</i>	<b>38</b>
<i>4.2.3 Análise de associação</i>	<b>38</b>

4.2.4	<i>Análise de variantes genéticas raras</i>	40
4.2.5	<i>Confirmação de variantes por sequenciamento direto de Sanger</i>	42
4.3	<b>Investigação de autoanticorpos anti-IFN do tipo I</b>	42
4.4	<b>Análises estatísticas</b>	43
5.	<b>RESULTADOS E DISCUSSÃO</b>	44
5.1	<b>Caracterização dos indivíduos estudados</b>	44
5.1.1	<i>Caracterização clínica das mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação</i>	47
5.1.2	<i>Caracterização clínica da prole das mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação</i>	53
5.2	<b>Investigação de variantes raras em genes dos Erros Inatos da Imunidade</b>	57
5.2.1	<i>Grupo A – Síndrome Congênita do Zika</i>	58
5.2.2	<i>Grupo B – mulheres expostas durante a gestação</i>	65
5.2.3	<b>Coorte adicional – gêmeos dizigóticos com fenótipos discordantes para SCZ</b>	69
5.3	<b>Análise de associação genética ao fenótipo da Síndrome Congênita do Zika</b>	72
5.4	<b>Investigação de autoanticorpos anti-IFN do tipo I</b>	77
6.	<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS</b>	83
7.	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	87
<b>Anexo A</b>	<b>Termos de Consentimento Livre e Esclarecido</b>	<b>100</b>
<b>Anexo B</b>	<b>Qualidade das amostras de DNAg</b>	<b>102</b>
<b>Anexo C</b>	<b>Defeitos monogênicos relacionados a susceptibilidade específica a condições causadas por infecções virais</b>	<b>106</b>
<b>Anexo D</b>	<b>Controle de qualidade de variantes genéticas dos grupos A e B na análise de associação à Síndrome Congênita do Zika</b>	<b>107</b>
<b>Anexo E</b>	<b>Distribuição das variantes comuns observadas em relação a distribuição teórica (QQ plot)</b>	<b>108</b>
<b>Anexo F</b>	<b>Distribuição das variantes raras observadas em relação a distribuição teórica (QQ plot)</b>	<b>109</b>

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Zika vírus

#### 1.1.1 Etiologia e epidemiologia

Em abril de 1947, um macaco Rhesus (*Macaca mulatta*) apresentou febre na floresta Zika, na Uganda. Esse animal era utilizado pela Fundação Rockefeller como sentinela no rastreamento de febre amarela. Uma amostra do soro deste Rhesus foi injetada em camundongos e, 10 dias depois, os animais cuja inoculação foi intracerebral, ficaram doentes; o agente transmissível foi isolado e cunhado de Zika vírus (ZIKV) (Dick et al. 1952). Um ano depois, o ZIKV foi isolado a partir de mosquitos *Aedes africanus*, na mesma floresta (Haddow et al., 1964) e mais tarde, em mosquitos *Aedes aegypti* na Malásia (Marchette et al., 1969). No período de 1951 até 1981, evidências sorológicas do ZIKV em humanos foram reportadas em diversas regiões da África e da Ásia (Jan et al., 1978; Olson et al., 1981). Entre 1968 e 1975, o ZIKV foi isolado de pacientes na Nigéria, o único sintoma descrito era febre sem outros detalhes clínicos, com exceção de um menino de 10 anos com febre, dor de cabeça e dores do corpo (Moore et al., 1975; Fagbami, 1977).

Apesar dos pequenos surtos africanos e asiáticos nesse período, o vírus continuou sem grande visibilidade. Isso mudou no ano de 2007, quando um surto nas Ilhas Yap, nos Estados Federados da Micronésia no Oceano Pacífico, afetou aproximadamente 73% da população, que manifestou uma doença caracterizada por irritação cutânea, artralgia e conjuntivite. O material genético do ZIKV foi identificado em amostras sorológicas de pacientes na fase aguda da doença, mostrando que o vírus havia se espalhado além da sua distribuição geográfica anterior (Lanciotti et al., 2007; Duffy et al., 2009).

Mais tarde, em 2013, houve o segundo surto na região do Pacífico, na Polinésia Francesa. Desta vez, o ZIKV infectou aproximadamente 11,5% da população (Cao-Lormeau et al., 2014; Jouannic et al., 2016) e, apesar dos sintomas serem similares aos registrados nas Ilhas Yap, surgiram casos de síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Oehler et al., 2014), uma rara doença autoimune em que há comprometimento dos nervos periféricos, podendo levar à paralisia (Broutet et al., 2016). Em 2014 o ZIKV se espalhou rapidamente pelas ilhas do Pacífico, incluindo Nova Caledônia, Ilha de Páscoa, e Ilhas Cook (Dupont-Rouzeyrol et al., 2014; Petersen et al., 2016).

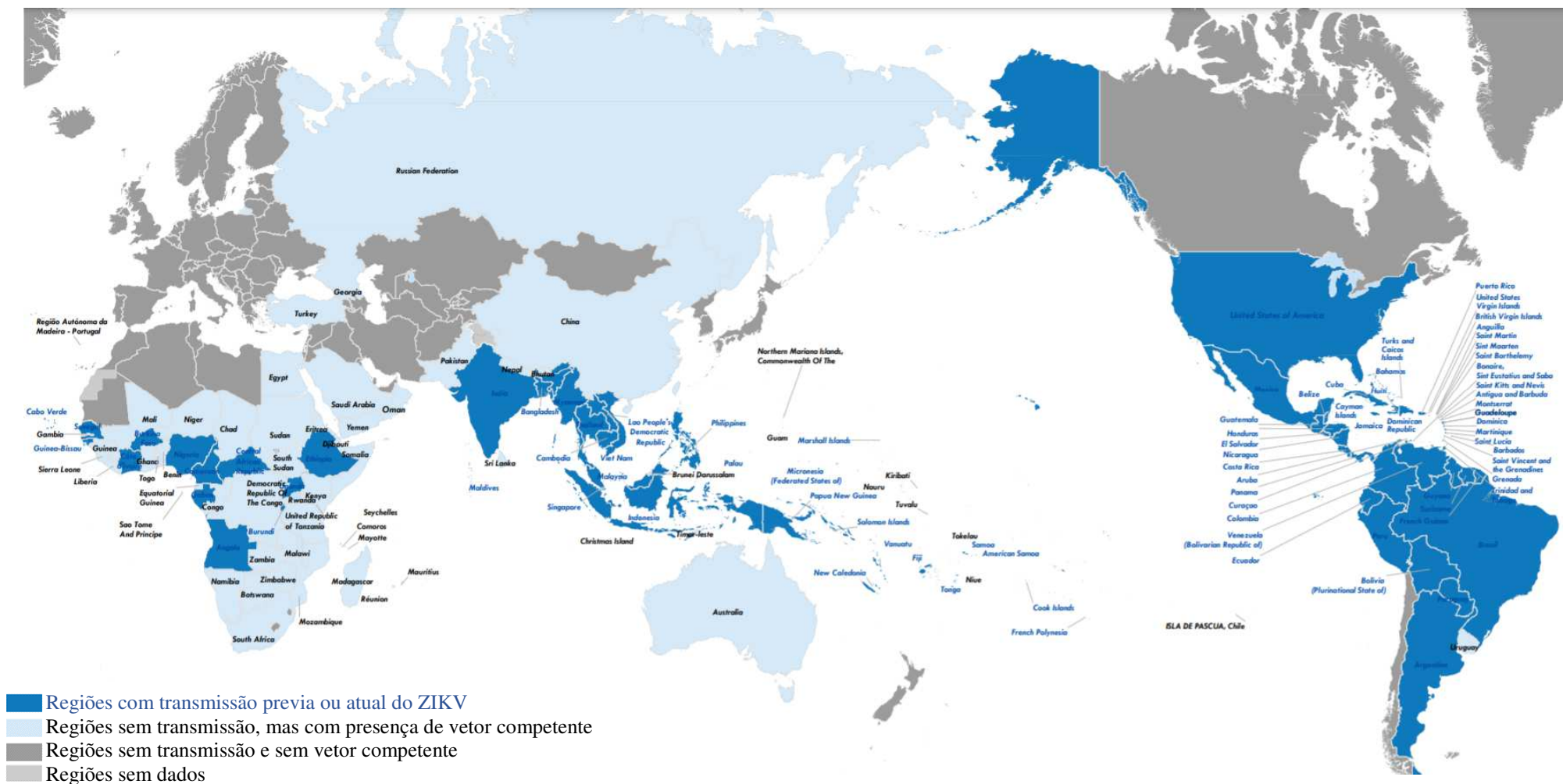


Estudos filogenéticos apontam que o ZIKV migrou para as Américas a partir das ilhas do Pacífico (Zanluca et al., 2015), chegando no Brasil em 2015, onde os primeiros casos foram registrados no estado da Bahia, em fevereiro (Campos et al., 2015). Acredita-se que o trânsito de pessoas criado devido a eventos internacionais no Brasil no ano de 2014 e 2015 tenha contribuído para o surto de ZIKV no país e também para sua posterior disseminação pela América do Sul, América Central, Caribe e o sul dos EUA (Kindhauser et al., 2016). Em maio de 2015 o Ministério da Saúde brasileiro fez o primeiro anúncio oficial sobre a infecção pelo ZIKV no país como uma emergência de saúde pública, e foi estimado que entre 440.000 e 1,3 milhões de pessoas foram infectadas até o final de 2015 (Hennessey et al., 2016). Devido ao desconhecimento sobre a quantidade de casos assintomáticos, é difícil apontar qual o real nível de exposição da população, porém um estudo sorológico conduzido em Salvador mostrou que 63% da população possuía anticorpos contra o ZIKV no sangue periférico até 2016, indicando a limitação de futuros surtos na região (Netto et al., 2017).

O aumento na prevalência de infecções pelo ZIKV no Brasil coincidiu com a ocorrência de microcefalia, uma malformação congênita que resulta em diminuição do tamanho da cabeça durante o desenvolvimento embrionário que pode levar a diversas complicações, incluindo atraso de desenvolvimento (ECDC, 2015). As complicações em neonatos cujas mães foram infectadas durante a gestação foram cunhadas de Síndrome Congênita do Zika (SCZ) (Mlakar et al., 2016). O surgimento de novas manifestações neurológicas e a rápida disseminação da doença levou a Organização Mundial da Saúde (OMS) a declarar, no início de 2016, o Zika como uma emergência de saúde pública de interesse internacional (WHO, 2016).

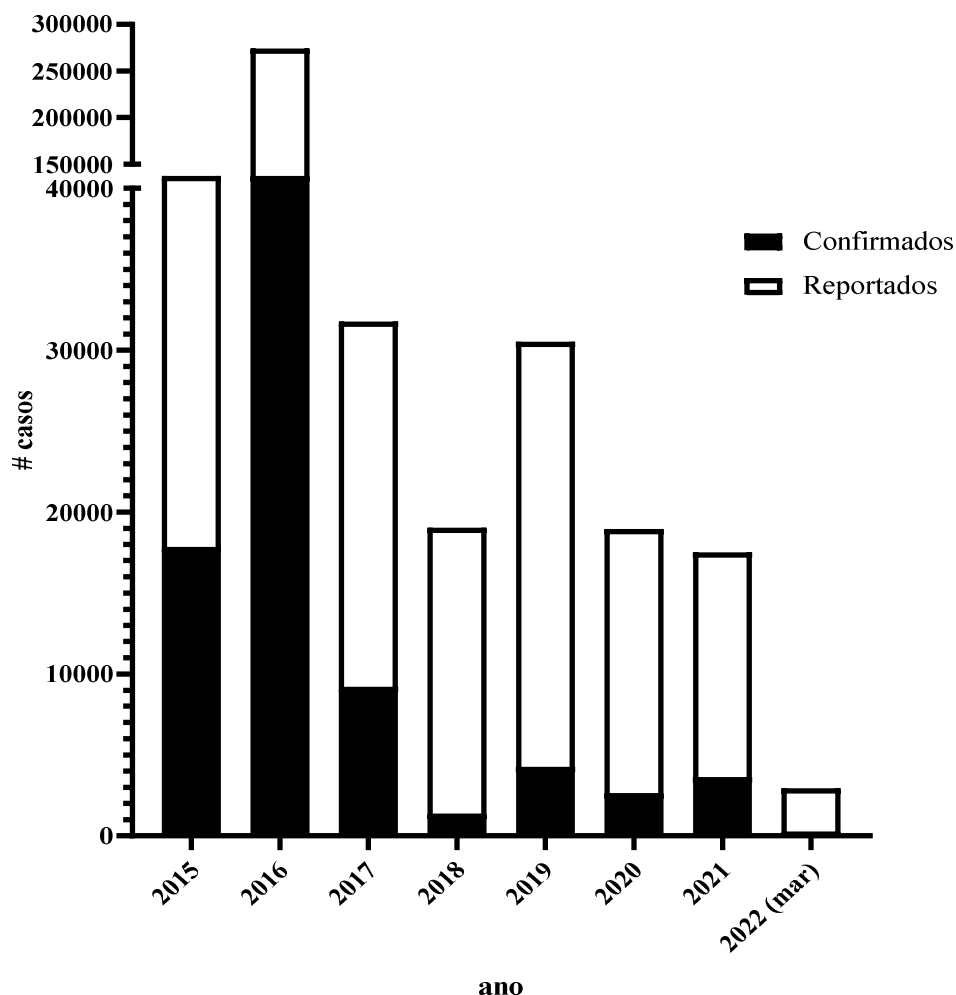
Até o último relatório de atualização epidemiológica do Zika vírus feito pela OMS, em julho de 2019, 87 países e territórios possuíam evidências de transmissão autóctone do ZIKV e mais 61 países possuem o vetor, mas sem evidências até aquele momento de transmissão do vírus (Figura 1). A incidência de ZIKV nas Américas teve seu pico em 2016 e foi declinando substancialmente nos anos seguintes, e a hipótese mais comum para explicação deste fenômeno seria a imunidade coletiva adquirida pela população das regiões mais afetadas, como a Polinésia Francesa e a região nordeste do Brasil (Masmajan et al., 2020). Todavia o vírus se mantém em circulação e existe o potencial de novos surtos em regiões com vetor competente e população susceptível, com especial preocupação com mulheres em idade fértil. Relatos de pequenos surtos de infecção pelo ZIKV e casos de SCZ ocorreram na Índia (Grubaugh et al., 2019), Sudeste Asiático

(Lan et al., 2017; Moi et al., 2017; Wongsurawat et al., 2018) e Angola (Sasseti et al., 2018; Hill et al., 2019), mas de dimensões muito inferiores ao surto das Américas.



**Figura 1. Distribuição geográfica do Zika vírus até julho de 2019.** As áreas indicadas em azul escuro são aquelas com transmissão prévia ou atual de infecção pelo Zika vírus, as áreas em azul claro são regiões que possuem o vetor, porém não apresentaram transmissão até o momento, e as áreas em cinza não possuem registro de transmissão nem presença do vetor. Fonte: Adaptado de WHO, 2020(disponível em [https://www.who.int/ith/Zika\\_map.pdf?ua=1](https://www.who.int/ith/Zika_map.pdf?ua=1) [acessado em 04/05/2022]).

No Brasil, relatos de infecção pelo ZIKV continuam ocorrendo, na casa dos milhares, embora haja baixo número de confirmação das suspeitas diagnósticas e os números de casos reportados parece ter se estabilizado na casa dos milhares nos últimos anos (Figura 2). Já os casos suspeitos de SCZ tiveram seu pico em 2016, com números baixando progressivamente nos anos subsequentes (Tabela 1). A pandemia de COVID-19 pode ter interferido no número de casos de ZIKV e SCZ reportados entre 2020 e 2022, mesmo com números mais baixo, evidencia-se a sustentação da circulação do arbovírus, o que possibilita que a infecção pelo ZIKV se torne endêmica no país e por isso, é de extrema importância que os mecanismos causativos da síndrome congênita sejam esclarecidos



**Figura 2. Casos de infecção pelo Zika vírus no Brasil.** Em branco os casos presumidos reportados e, em preto os casos confirmados de infecção pelo ZIKV no país. Fonte: Dados retirados dos relatórios anuais enviados para a Pan American Health Organization

(<https://www3.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika/524-zika-weekly-en.html> [acessado em 04 de maio de 2022]).

**Tabela 1.** Casos suspeitos de Síndrome Congênita do Zika reportados no Brasil entre março de 2015 e julho de 2022.

<b>Etiologia</b>	<b>2015</b>	<b>2016</b>	<b>2017</b>	<b>2018</b>	<b>2019</b>	<b>2020</b>	<b>2021</b>	<b>2022 (julho)</b>
Vírus Zika	846	916	63	55	15	13	9	1
STORCH	17	53	73	76	55	35	52	6
Coinfecção (STORCH + Zika)	2	5	2	5	1	4	6	1
Etiologia desconhecida	109	335	227	126	46	46	29	5
Não informado / ignorado	3.155	7.278	2.293	1.470	1.396	931	711	355
<b>TOTAL</b>	<b>4.129</b>	<b>8.587</b>	<b>2.658</b>	<b>1.732</b>	<b>1.513</b>	<b>1.029</b>	<b>807</b>	<b>368</b>

Fonte: Ministério da Saúde/SVS - REGISTRO DE EVENTOS EM SAÚDE PÚBLICA (RESP-Microcefalia) [acessado em 19/12/2022].

Notas:

1. Data da atualização dos dados 07/2022.

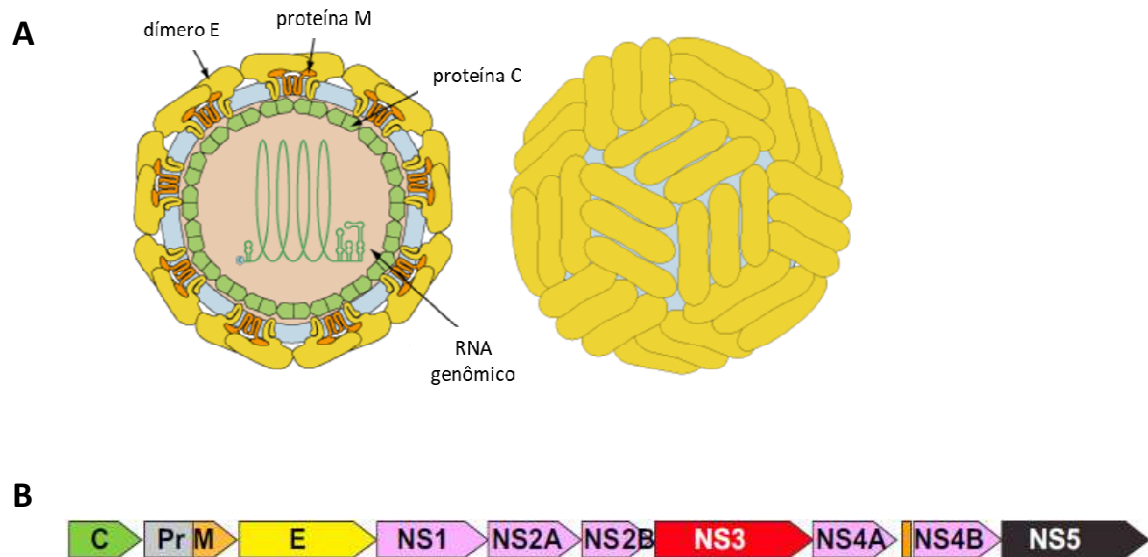
2. Entre 2015 e março de 2016, as notificações foram realizadas na vigência do Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia Relacionada à Infecção pelo Vírus Zika, publicado em 09 de dezembro de 2015 (<https://bit.ly/3gfJN7t>). A partir de 24 de março de 2016, as notificações eram realizadas com base no Protocolo de Vigilância e Resposta à Ocorrência de Microcefalia e/ou Alterações do Sistema Nervoso Central (SNC). A partir de 12 de dezembro de 2016, as notificações passaram a ser realizadas com base no documento Orientações Integradas de Vigilância e Atenção à Saúde no Âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional (<https://bit.ly/3obHMO3>). Em 2021, foi publicado o documento Guia de Vigilância em Saúde - 5ª edição (<https://bit.ly/3bRFNeg>) e desde então, esse é o documento de referência para a notificação, investigação e conclusão dos casos suspeitos de SCZ em todo o território nacional.

3. Devem ser considerados casos confirmados para a Síndrome Congênita associada à infecção pelo vírus Zika aqueles com classificação final igual a “confirmado” e etiologia igual a “Vírus Zika”.

### **1.1.2 Estrutura do ZIKV**

O ZIKV é um patógeno da família *Flaviviridae* e do gênero *flavivírus* (Chambers et al., 1990), que inclui outros vírus de importância clínica, como o da febre amarela (YFV), Febre do Nilo Ocidental (WNV) e o vírus da dengue (DENV). Os flavivírus são vírus icosaédricos, envelopados e infectam mamíferos. Possuem RNA fita simples com polaridade positiva e com genoma de aproximadamente 11.000 bases, que contém um único quadro de leitura que codifica uma poliproteína que é clivada pós-traducionalmente por proteases virais e do hospedeiro, gerando 3 proteínas estruturais (capsídeo - C, pré-membrana - PrM e envelope - E) e 7 proteínas não estruturais (NS1,

NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Hasan et al., 2018) (Figura 3). As proteínas estruturais têm como função o encapsulamento do RNA viral, assim como são responsáveis por mediar a ligação, fusão e entrada do RNA viral na célula hospedeira, enquanto as proteínas não estruturais regulam a transcrição viral e formam a maquinaria de replicação do vírus (Hasan et al., 2018).



**Figura 3. Estrutura do ZIKV.** Organização estrutural do vírus evidenciando a estrutura tridimensional, com os dímeros E, as proteínas M e C(A) e o RNA genômico mostrando a disposição da sequência a ser traduzida em poliproteína, que será clivada por diferentes enzimas nas regiões indicadas pelo final das flechas(B). Fonte: (A) adaptado de Viral Zone 2016, Swiss Institute of Bioinformatics e (B) Ming et al., 2016.

Os flavivírus utilizam suas glicoproteínas estruturais para se ligar à célula-hospedeira, interagindo com diversos receptores e ativando o processo de endocitose pela célula-alvo. Uma importante proteína neste processo é a proteína estrutural E, que está associada a ligação a receptores na célula-alvo, fusão de membranas, e entrada do vírion na célula, enquanto a proteína PrM auxilia no dobramento, montagem e função de E (Lindenbach, Rice, 2003).

A entrada do ZIKV na célula é coordenada pela proteína E em diversos tipos celulares, como queratinócitos, fibroblastos, células dendríticas imaturas e células tronco derivadas de progenitores neuronais (Routhu, Byrareddy, 2017). Uma vez que o vírion adentra o citoplasma, as proteínas NS formam um complexo de replicação que sintetiza a fita de RNA negativa complementar ao RNA viral, que então serve de molde

para a síntese do RNA positivo que será envolto pelo capsídeo, transportado pela via secretória do hospedeiro e liberado da célula através de exocitose (Persaud et al., 2018).

De maneira geral, dentre as proteínas NS, as mais proeminentes são a NS5, que participa da produção da fita complementar negativa do RNA viral, e a NS3 que também participa diretamente da replicação do RNA viral. Já as outras proteínas NS contribuem para a montagem e manutenção dos complexos de replicação (Ming et al., 2016).

### **1.1.3 Transmissão**

A principal transmissão de ZIKV ocorre através de vetores artrópodes, especificamente mosquitos do gênero *Aedes* (Diagne et al., 2015), sendo o *A. aegypti* o principal vetor; transmissão por *A. albopictus* foi documentada em poucos casos, como no Gabão (Grard et al., 2014) e mais recentemente na França (Parola et al., 2020).

Entretanto, diferente de outras arboviroses, o ZIKV também pode ser transmitido por outras rotas de contato direto humano-a-humano. Um estudo sobre a evolução molecular do ZIKV mostrou que o vírus pode ter passado por várias mudanças genéticas adaptativas (embora incomum entre os flavivírus) que podem estar relacionadas à falta de preferência por espécies de hospedeiro e vetor (Ioos, 2014).

A transmissão materno-fetal pode ocorrer em qualquer momento da gestação e estima-se que aconteça em 20-30% dos casos de mulheres infetadas durante a gestação (Besnard et al., 2014; Mlakar et al., 2016; Pomar et al., 2018). Não há relação clara entre o momento da infecção e o impacto da transmissão, porém infecções durante o primeiro trimestre de gravidez possuem maior risco para o desenvolvimento da SCZ (Hoen et al., 2018). A transmissão sexual do ZIKV foi a primeira documentada dentre as arboviroses, sendo especialmente importante em homens, nos quais partículas virais são detectadas no sêmen por uma média de 30 dias após início dos sintomas, porém existem casos com persistência longa de até 281 dias (Musso et al., 2015; Mead et al., 2018).

Além disso, também é teoricamente possível a transmissão por transfusões sanguíneas, transplantes de órgãos e fluidos corporais (como lágrimas e saliva) de pessoas infectadas (Musso et al., 2014; Miner et al., 2016; Swaminathan et al., 2016; Tan et al, 2017), devido à presença de partículas virais na urina e saliva nos primeiros dias de infecção (Bonaldo et al., 2016), seguido de viremia no sangue periférico por 15 a 28 dias (Roze et al., 2016; Mansuy et al., 2016; Lustig et al., 2016); ainda, há relato da

presença de RNA viral na mucosa dos olhos por até 30 dias após o início dos sintomas, indicando a persistência da infecção nos fluidos corporais no período de convalescença (Tan et al, 2017).

#### ***1.1.4 Manifestações clínicas***

Os sintomas típicos associados à infecção pelo ZIKV são geralmente leves e autolimitados e possuem duração média de 7 dias, compondo a chamada fase aguda da doença. Nessa fase os principais sintomas descritos são febre, irritação cutânea, conjuntivite, artralgia, mialgia e dores periarticulares ou artrite (Musso, Gubler, 2016), porém estima-se que apenas 20% dos infectados manifestem a doença (Bowen et al., 2017b). Como os sintomas são inespecíficos, a infecção durante a fase aguda pode ser clinicamente confundida com dengue e chikungunya, que são transmitidas pelo mesmo vetor (Marano et al., 2016), porém o teste sorológico é capaz de diferenciar entre o Zika e outras arboviroses (Aubry et al., 2015).

Apesar dos sintomas geralmente leves, a recente epidemia nas Américas revelou casos de manifestações clínicas graves associadas a infecção pelo ZIKV. Foram reportados problemas neurológicos em adultos, como meningoencefalite, mielite e Síndrome de Guillain-Barré (dos Santos et al., 2016; Brasil et al., 2016a; Ferreira et al., 2020); infecção ocular, resultando em uveíte e até em inflamações graves que podem levar à cegueira (Furtado et al., 2016); e asmalformações congênitas em neonatos (Mlakar et al., 2016).

O grande número de casos de microcefalia durante o surto no Brasil levou a duas observações importantes sobre o ZIKV, a primeira é que a linhagem que causou a epidemia desenvolveu um neurotropismo, em especial por células precursoras neuronais (CPNs), e a segunda é que o grau de morte das CPNs causado pelo vírus é extremamente elevado para que haja uma perda tão grande de volume cerebral (Li et al., 2016a). A SCZ é uma combinação de anomalias neurológicas graves, incluindo defeitos estruturais cerebrais (como calcificações cerebrais, defeitos de corpo caloso, ventriculomegalia), microcefalia, hidropsia fetal, artrogripose, hipertonia (Pomar et al., 2019). Há considerável variabilidade clínica, e a presença de microcefalia não é necessária para o diagnóstico de lesão neuronal fetal induzida pelo ZIKV (Schwartz, 2017a; Soares de Oliveira-Szejnfeld et al., 2016).



Estima-se que 5 a 14% das mulheres infectadas pelo ZIKV durante a gestação venham a ter crianças com SCZ, já as manifestações mais graves, como microcefalia e outras anormalidades do Sistema Nervoso Central(SNC) estão presente em menor porcentagem, 3 a 6% (Musso et al., 2019; Martins et al., 2021). Entretanto, estudos prospectivos de acompanhamento de crianças expostas ao ZIKV durante a gestação têm mostrado que mesmocranças clinicamente normais ao nascimento podem apresentar complicações, como alterações motoras, neurológicas e de desenvolvimento, em especial na área da fala (Vianna et al., 2019; Mulkey et al., 2020; Peçanha et al., 2020).

### ***1.1.5 Patogênese do Zika vírus***

O ZIKV possui tropismo amplo, os órgãos mais afetados são o cérebro, placenta, testículos e retina, porém o vírus também pode ser detectado em diversos fluidos corporais, como saliva, urina, sangue, fluido amniótico, sêmen, secreções vaginais e lágrimas (Miner et al., 2017). Assim como em outras arboviroses, o ZIKV é capaz de infectar células da pele e sangue, como queratinócitos, fibroblastos e células de Langherans (Cerny et al., 2014; Hamel et al., 2015).

O vírus entra na célula através da endocitose (Persaud et al., 2018), pela interação do envelope glicoproteico viral com receptores de membrana diversos nas diferentes célula-alvo. A maioria dos estudos apontam para o papel da proteína AXL na entrada viral (Liu et al., 2016; Meertens et al., 2017; Persaud et al., 2018), mecanismo bem descrito na entrada do DENV em células de mamíferos (Meertens et al., 2012). Apesar de AXL ser necessário para a infecção em alguns tipos celulares (Hastings et al., 2017; Meertens et al., 2017; Retallack et al., 2016; Savidis et al., 2016; Vicenti et al., 2018), existem células humanas e murinas que não expressam AXL e mesmo assim são susceptíveis à infecção (Wells et al., 2016; Rieder et al., 2019). De acordo com essa observação, diversos fatores já foram descritos como facilitadores da entrada do vírus, incluindo a família de receptores tirosina-quinase TAM (TYRO3, AXL e MER), proteínas TIM (*T cell immunoglobulin and mucin domain proteins*), receptores de lectina do tipo C e receptores de fosfatidilserina (Perera-Lecoin et al., 2013), além de DC-SIGN (Bowen et al., 2017a).

Esses receptores são altamente expressos na superfície de células endoteliais, células T, DCs, macrófagos, células NK imaturas, células de Sertoli (testículo) e células epiteliais de pigmento da retina (Pagani et al., 2017). Em estudos *in vitro* com

leucócitos de linhagens humanas mostraram uma predileção pela infecção de monócitos (Michlmayr et al., 2017) e também células dendríticas (DCs, do inglês *Dendritic Cells*) (Bowen et al., 2017a); nas DCs o vírus parece ser capaz de suprimir a maturação da célula, influenciando diretamente a função de células T, além de usar a DC para sustentação da replicação viral (Bowen et al., 2017a; Wang et al., 2020). Entretanto, as células T são resistentes à infecção, sugerindo que também pode haver outros receptores ou mecanismos pós-entrada que determinam o tropismo viral (Hamel et al., 2015).

O mecanismo da lesão do SNC na infecção fetal pelo ZIKV é muito estudado tanto em modelos *in vitro*, quanto em animais, visando elucidar as bases das manifestações clínicas apresentadas por seres humanos. Trabalhos mostraram que o vírus é capaz de evadir à resposta imune materna infectando células do sistema imune e assim, chegando ao embrião (Quicke et al., 2016; Simoni et al., 2016; Schwartz, 2017b). Modelos *in vitro* de CPNs, neuroesferas e organoides cerebrais mostraram que o ZIKV leva à uma inflamação inicial pela ativação de TLR-3, que por sua vez leva a ativação de sinalizações que dirigem a neurogênese e apoptose de CPNs (Dang et al., 2016), seguida de redução na proliferação e morte dessas células (Cugola et al., 2016; Garcez et al., 2016); além disso, a morte celular parece ocorrer também por mecanismos além da apoptose (Azevedo et al., 2018; Monel et al., 2017). Uma via ativada é a autofagia, um processo intracelular de degradação e reciclagem que leva moléculas do citoplasma aos lisossomos (Ohsumi et al., 2014); infecção de fibroblastos leva à formação de autofagossomos (Hamel et al., 2015) e, em CPNs fetais, a infecção causa a inibição da via de Akt-mTOR, levando à ativação de autofagia e neurogênese anormal (Liang et al., 2016).

Primatas não humanos (PNH) são o modelo mais relevante para o estudo da infecção congênita pelo ZIKV em humanos, pois ambos possuem similaridade no processo gestacional, além de terem neuroanatomia e desenvolvimento do sistema imunológico bastante semelhantes (Simmons et al., 2016; Mohr et al., 2018; Dudley et al., 2019). Entretanto os números amostrais são uma limitação e, na maioria dos trabalhos reportados até o momento, as infecções por ZIKV durante a gestação de PNH apresentaram poucos casos de problemas graves no SNC dos fetos, consistente com a história natural da infecção congênita em humanos (Dudley et al., 2019; Vanella et al., 2020). Já os modelos murinos são mais explorados, e diversas linhagens foram utilizadas para estudar a infecção congênita pelo ZIKV. Filhotes de fêmeas infectadas podem exibir lesão cerebral, com morte celular massiva por apoptose e autofagia, e

diminuição de tamanho corporal como um todo;entretanto, em linhagens imunocompetentes, não há o desenvolvimento de sintomas graves da doença e os animais susceptíveis são aqueles com algum comprometimento da resposta imune,em especial com ausência de componentes da resposta de interferon do tipo I (Cugola et al., 2016; Rossi et al., 2016), o que demonstra a importância da resposta imune antiviral do hospedeiro na infecção pelo ZIKV.

#### *1.1.5.1 Receptores de reconhecimento de padrões na infecção pelo ZIKV*

RIG-I e MDA-5 são membros de uma família de receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês *pattern recognition receptors*) citoplasmáticos chamados de RLRs (do inglês, *(RIG)-I-like-receptors*). RLRs estão presentes em quase todas as células humanas e são capazes de reconhecer estruturas únicas do RNA viral, o RNA fita-dupla (Loo, Gale, 2011). Resumidamente, após a ligação ao ligante, RIG-I e MDA-5 sofrem alterações conformacionais, aumentando a capacidade de interação com o MAVS (proteína sinalizadora mitocondrial antiviral) (Wies et al., 2013), que sofre oligomerização e recruta uma série de fatores, entre eles NEMO (modulador essencial de NF- $\kappa$ B), que por sua vez, recruta IKK $\epsilon$  e TBK1, que juntas fosforilam e ativam os fatores de transcrição IRF-3 e IRF-7, bem como o NF- $\kappa$ B, através da fosforilação e degradação do inibidor de kappa-B (I $\kappa$ B). Com a translocação nuclear, IRF-3 promove a transcrição de interferons (IFN) tipo I e III e ativa diretamente a transcrição de genes efetores antivirais, enquanto o NF- $\kappa$ B leva a uma indução precoce de IFN tipo I e principalmente à produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias (Loo et al., 2011; Schlee et al., 2013).

Os receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês *Toll-like receptors*) são uma outra família de PRRs, que possui alguns membros endossomais que também são capazes de reconhecer RNA viral, como o TLR-3, que também reconhece o RNA dupla-fita e TLR-7 e TLR-8, que reconhecem RNA viral fita simples (Kawai et al., 2011). A sinalização a jusante dos TLRs, também culmina na ativação de NF- $\kappa$ B e membros da família de IRFs (do inglês *IFN regulatory factors*), induzindo a resposta antiviral, caracterizada pela expressão de genes estimulados por IFN (ISGs, do inglês *IFN stimulated genes*) e produção de IFNs (Takeuchi, Akira, 2010).

Estudos tem mostrado a importância do papel dos sensores de RNA viral na imunidade contra o ZIKV. Como esperado, na infecção pelo ZIKV em células humanas e murinas, ocorre aumento de expressão de *DDX58* (RIG-I), *MDA5*, *TLR3* e *IRF7* (Hamel et al., 2015; Li et al., 2016b); alternativamente, silenciamento *in vitro* de RIG-I, MDA-5 e TLR-3 leva a um acúmulo de ZIKV em fibroblastos (Hamel et al., 2015). A sinalização de RIG-I em DCs humanas tem uma capacidade de restringir a replicação do ZIKV com efeito maior do que a sinalização de IFN- $\beta$  (Bowen et al., 2017a; Schilling et al., 2020). Já o papel do TLR-3 ainda não está completamente elucidado; como já citado, seu bloqueio pode levar ao aumento da replicação do vírus em alguns modelos *in vitro* (Hamel et al., 2015), porém, sua ativação em astrócitos leva a uma diminuição da resposta antiviral e aumento da replicação viral (Ojha et al., 2019) e, complementarmente, inibição de TLR-3 em CPNs leva à diminuição de morte neuronal (Dang et al., 2016; Zhang et al., 2016), indicando um papel patogênico dessa molécula durante a infecção de células do nervosas. Acredita-se que o mecanismo patogênico de TLR-3 em astrócitos e CPNs humanas se deva à produção de IL-6 após ativação de TLR-3, ativando STAT3, que leva à produção de SOCS3, que, por sua vez, é capaz de bloquear a fosforilação de STAT1 e diminuir a resposta de IFN do tipo I (Plociennikowska et al., 2021).

#### *1.1.5.2 Resposta antiviral de interferons*

A resposta antiviral em vertebrados é orquestrada principalmente pela via de sinalização de IFN (Fensterl, Sen, 2009). IFN dos tipos I e III podem ser produzidos pela maioria dos tipos celulares, após o reconhecimento de padrões moleculares virais. Essas citocinas são capazes de restringir a infecção pelo ZIKV em camundongos e células humanas (Chaudhary et al., 2017). Os IFNs do tipo I (IFN $\alpha$  e IFN $\beta$ ) estão envolvidos e são essenciais para o controle da replicação e disseminação viral na maioria dos tipos celulares (Platanias et al., 2005; Samuel et al., 2005; Best et al., 2006). Após o estímulo de seu receptor (dímero IFNAR1 e IFNAR2), os IFN $\alpha/\beta$  ativam Jak1 e Tyk2 e, subsequentemente, transdutores de transcrição (STAT1 e STAT2), levando à transcrição de uma série de ISGs, além dos próprios IFN do tipo I, como já citado anteriormente, tornando as células refratárias à infecção viral e também levando à apoptose das células infectadas (Frumence et al., 2016), induzindo o estado antiviral.

Já o IFN do tipo III medeia respostas antivirais principalmente em células epiteliais, incluindo os sincitiotrofoblastos, que são uma camada de células epiteliais especializadas das vilosidades placentárias (Robbins et al., 2010); esses trofoblastos produzem constitutivamente IFN  $\lambda$ , um IFN do tipo III, e diferentes estudos observaram que essa citocina confere proteção à infecção por ZIKV na placenta de camundongos e humanos (Bayer et al., 2016; Corry et al., 2017), apesar dos efeitos protetores parecerem ser dependentes do estágio gestacional (Jagger et al., 2017).

Animais *knockout* para componentes da resposta de INF do tipo I têm sido muito utilizados para elucidar a patogênese do ZIKV. Camundongos A129 (deficientes para IFNAR1), quando infectados por diferentes linhagens de ZIKV e por diferentes rotas de infecção, apresentaram perda de peso, encurvamento da coluna, fraqueza nos membros inferiores, paralisia e até morte (Dowall et al., 2016; Lazear et al., 2016). Também foi observado em animais A129, inflamação em regiões imunoprivilegiadas, incluindo olhos e testículos (Ma et al., 2016), o que corrobora o observado em humanos. Além disso, camundongos *knockout* para fatores de transcrição da via de IFN do tipo I, como IRF3, IRF5 e IRF7, apresentam sintomas similares aos A129 (Lazear et al., 2016). Já os camundongos AG129, uma linhagem deficiente para receptores de IFN do tipo I e II, apresentam sintomas ainda mais graves, como tremores e ataxia (Aliota et al., 2016), indicando o potencial papel também do IFN do tipo II na patogênese do ZIKV. Entretanto, quando o ZIKV ativa seletivamente a sinalização de IFN do tipo II, em detrimento da produção de IFN do tipo I, há um aumento na replicação viral (Chaudhary et al., 2017).

Adicionalmente, em situações de infecção viral, ocorre a realocação de TBK-1 do centróssomo - onde desempenha função vital à divisão celular -, para mitocôndria, onde essa proteína ativa IRF3; sem o TBK-1 no centróssomo, a divisão é interrompida e, conseqüentemente, ocorre a apoptose (Onorati et al., 2016), o que é um processo geralmente desejável em uma célula do hospedeiro infectada por vírus, porém pode ser um preço alto demais a se pagar em um organismo em desenvolvimento com alto número de células em divisão. Portanto, TBK-1 possui um papel chave na conversa entre as vias de sinalização da imunidade inata e da neurogênese na patogênese do ZIKV.

#### 1.1.5.3 Imunidade adaptativa contra o Zika vírus

Apesar da resposta inata ter um peso maior na infecção, a combinação com a resposta adaptativa também é importante para o controle do ZIKV. A depleção ou deficiência de células T em camundongos na presença de antagonistas de IFN, resulta em alta viremia e doença associada, demonstrando que a resposta adaptativa também é fundamental para o controle da infecção quando há o comprometimento da resposta IFN tipo I (Elong Ngonu et al., 2017). Além disso, a transferência adotiva de células T CD8<sup>+</sup> ZIKV-específicas também é capaz de prevenir a doença em camundongos A129 (Huang et al., 2017). Estudos mostraram que há forte, porém curta, resposta de células T aproximadamente 7 dias após a infecção de camundongos selvagens (Winkler et al., 2017; Huang et al., 2017), com rápida proliferação de células T CD4<sup>+</sup> de perfil inflamatório T *helper* 1, com produção de IFN- $\gamma$ , TNF- $\alpha$  e IL-2. Concomitantemente, células T CD8<sup>+</sup> proliferam e expressam marcadores de atividade citotóxica, sugerindo resposta específica ao vírus; além disso, vacinas que visam apenas a indução de respostas de células T CD8<sup>+</sup> se mostraram eficientes contra a infecção pelo ZIKV em camundongos (Gambino et al., 2021). Entretanto, quando a resposta de IFN do tipo I está intacta, a ausência de células T não resulta em doença, mostrando que, ao menos em murinos, a resposta inata parece ser suficiente para controlar a infecção (Winkler et al., 2016).

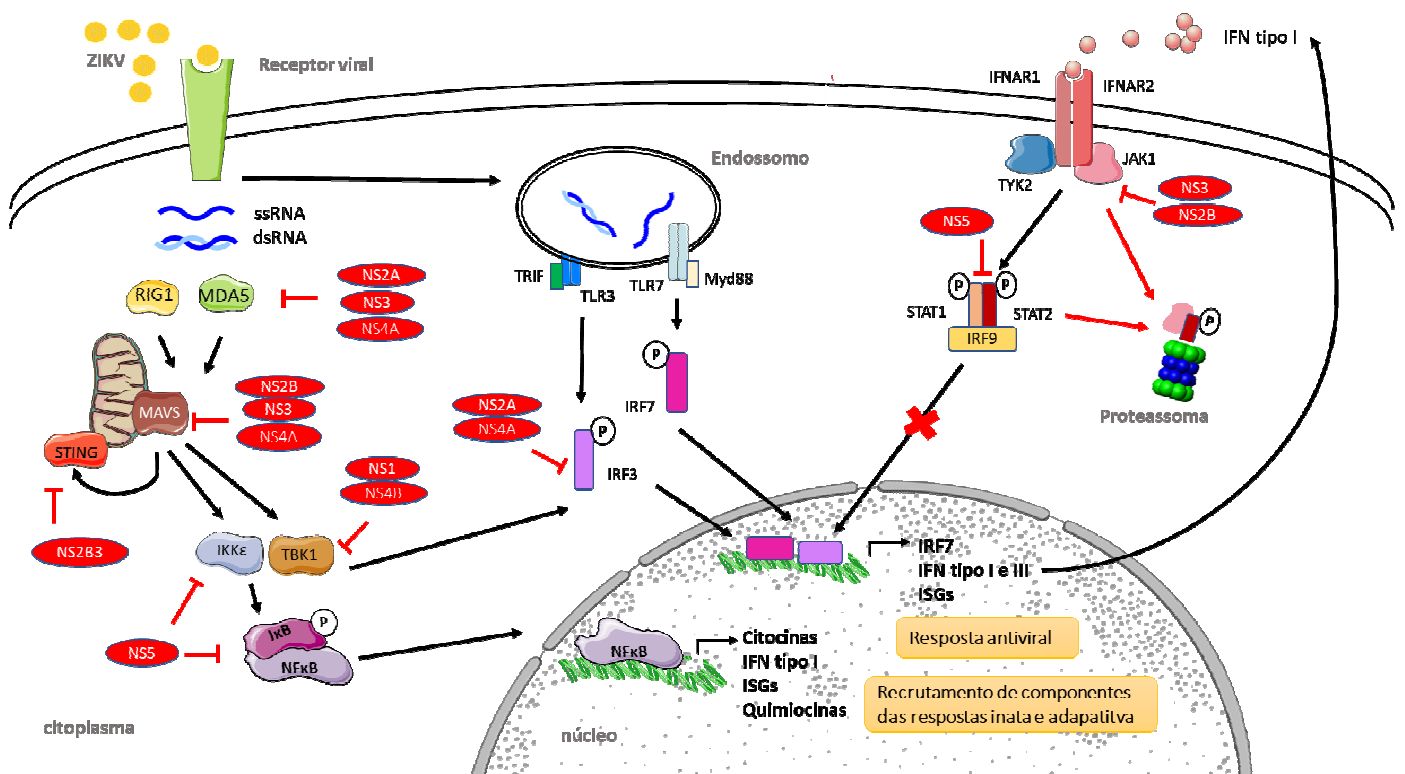
A produção de anticorpos específicos contra o ZIKV também é importante para o controle da infecção em modelos murinos (Larocca et al., 2016). Uma vacina de DNA contendo as sequências codificantes para as proteínas E e PrM do ZIKV protegeu camundongos da infecção viral, sendo a resposta majoritariamente composta de anticorpos anti-E (Larocca et al., 2016); a mesma vacina também mostrou efeito protetor em macacos Rhesus (Abbinck et al., 2016). As proteínas estruturais E e PrM, assim como a proteína secretada NS1, são os maiores alvos de anticorpos específicos (Muller, Young, 2013; Stettler et al., 2016).

#### *1.1.5.4 Mecanismos de evasão imune do Zika vírus*

A defesa imunológica contra o ZIKV implica no reconhecimento do vírus, indução da resposta de IFN do tipo I, inibição da replicação viral nas células-alvo e, finalmente, em ativação da resposta imune adaptativa específica. Entretanto, como a maioria dos flavivírus, o ZIKV possui estratégias para burlar o sistema imune do hospedeiro. As mais evidentes são os mecanismos de evasão à imunidade antiviral, na qual na maioria dos

casos, o vírus utiliza suas proteínas não-estruturais para bloquear ou levar a degradação de moléculas que orquestram a resposta de IFN do tipo I (Figura 4).

O mecanismo de evasão mais bem estabelecido é a NS5 viral dirigindo STAT2 para a degradação no proteassoma (Kumar et al., 2016; Grant et al., 2016). STAT2 é ativado pelo receptor de IFN do tipo I e, na sua ausência, há deficiência na sinalização, o que permite o aumento da replicação viral. Isso ocorre em células humanas, porém o mesmo não é observado em camundongos imunocompetentes, nos quais a NS5 não consegue se ligar a STAT2, permitindo uma resposta de IFN do tipo I eficiente (Grant et al., 2016). Assim como os A129, camundongos deficientes para STAT2 são susceptíveis à infecção pelo ZIKV (Tripathi et al., 2017). Interessantemente, Chaudhary e colegas (2017) mostraram que a inibição do complexo STAT1-STAT2-IRF9 leva à formação do homodímero de STAT1 e ativa a via de IFN do tipo II e a produção de  $INF-\gamma$  e ISGs estimulados por ele (em especial CXCL10), estimulando a replicação viral; complementarmente, o silenciamento da expressão do receptor de IFN tipo II ou moléculas à jusante de sua via de sinalização suprimem a replicação viral (Chaudhary et al., 2017); além disso, NS5 também parece ser capaz de inibir a fosforilação de STAT1 (Hertzog et al., 2018), e a ativação dos promotores de RIG-I e  $IFN-\lambda I$  pela inibição de  $IKK\epsilon$  (Lundberg et al., 2019).



**Figura 4. Resposta de IFN do hospedeiro e mecanismos de evasão do ZIKV.** RIG-I e MDA5 reconhecem o RNA do ZIKV no citoplasma, levando à ativação de fatores de transcrição, como IRF-3 e NF- $\kappa$ B e subsequente transcrição de IFN $\alpha/\beta$ , e produção de citocinas pró-inflamatórias e ISGs. IFN tipo I é então traduzido e secretado, ligando-se aos receptores IFNAR1/2 em células na vizinhança, levando à ativação da sinalização JAK/STAT e à formação de complexo com IRF9, que transloca para o núcleo e se liga aos elementos de resposta estimulados por IFN, aumentando a expressão de ISGs. Estão também apontadas outras proteínas ou processos da resposta antiviral do hospedeiro e as proteínas não estruturais (NS) do ZIKV que inibem essa resposta. Fonte: autora.

Entretanto, todas as NS de ZIKV possuem algum papel na inibição da resposta antiviral. Super expressão de NS1, NS4a e NS5 inibe a sinalização de IRF3 e NF $\kappa$ B (Kumar et al., 2016). NS1 é capaz de ativar o inflamassoma dependente de NLRP3 em monócitos, clivando cGAS e inibindo a resposta de IFN do tipo I (Zheng et al., 2018), e simultaneamente estimulando a produção de IL-1 $\beta$  e IL-18 (Khaiboullina et al., 2017) e produção de IL-18 já foi associada a casos graves de microcefalia induzida pela infecção do ZIKV (de Sousa et al., 2018). A superexpressão de NS2B em conjunto com NS3 também interferem na sinalização JAK/STAT, interagindo com JAK1 e levando-a à degradação (Wu et al., 2017). NS1 e NS4B interagem com TBK-1, impedindo a ativação de IRF3 (Wu et al., 2017). NS3 junto a NS2B3 inibem MAVS e STING (ou MITA), respectivamente, levando à inibição da resposta de INF- $\beta$  (Li et al., 2019). NS3 é capaz de bloquear a translocação de RIG-I e MDA5 do citosol para a mitocôndria em linhagens de astrócitos (Riedl et al., 2019); também foi reportado que, assim como em DENV, o NS3 de ZIKV consegue clivar STING humano, diminuindo assim a expressão de IFN tipo I mediada pelo sensor de DNA cGAS (Ding et al., 2018), porém ainda não está claro se existem diferenças do tipo celular no antagonismo de NS3 dessas vias imunológicas inatas ou se os alvos de NS3 são divididos espacial ou temporalmente durante a infecção.

Em conjunto, esses estudos mostram diferentes maneiras que surgiram na coevolução do ZIKV com humanos para o bloqueio da resposta antiviral de IFN do tipo I e, apesar de nem todos os mecanismos de ação estarem completamente elucidados, é possível notar que existe uma redundância de funções, o que explica a inibição eficiente da resposta antiviral em alguns tipos celulares.

## **1.2 A teoria genética das doenças infecciosas e os erros inatos da imunidade**



A enorme variabilidade clínica entre indivíduos durante o curso natural das doenças infecciosas é um fenômeno que pode ser observado amplamente na história da humanidade. Principalmente, no caso de infecções causadas por um mesmo microrganismo que podem ser completamente silenciosas em um indivíduo e muito graves ou até fatais em outros (Casanova, Abel, 2013). Tipicamente nas doenças humanas, um patógeno mata apenas uma pequena parcela dos infectados (Casanova, 2015). Se a presença de um agente infeccioso é um gatilho ambiental necessário, porém não suficiente, para o desenvolvimento de uma enfermidade, qual seria a causa das doenças infecciosas graves?

A teoria genética das doenças infecciosas tem como premissa a ideia de que variantes genéticas do hospedeiro podem determinar a susceptibilidade, ou proteção, a patógenos específicos e, sendo assim, doenças infecciosas podem resultar determinantemente de erros inatos da imunidade (Bearn, 1993), tendo o patógeno como um gatilho ambiental, que torna um defeito inato antes silencioso, em um problema aparente. De fato, a partir da década de 90, estudos elucidaram defeitos monogênicos (mendelianos ou não) associados a infecções por patógenos específicos, incluindo micobactérias, pneumococos, candidíase mucocutânea e encefalite causadas por herpes simplex (Newport et al., 1996; Abel et al., 2010). Os genes envolvidos nos mecanismos de susceptibilidade encontrados por esses estudos codificam componentes do sistema imune, remetendo às imunodeficiências primárias (IDPs) (Casanova, Abel, 2007).

As IDPs eram classicamente definidas como doenças raras, monogênicas, mendelianas e de início precoce, caracterizadas principalmente por susceptibilidade a infecções oportunistas, recorrentes e graves, causadas por defeitos em componentes do sistema imune, ou seja, um defeito em um gene, torna o indivíduo susceptível a diversos tipos de patógenos (Notarangelo, 2010). Com o passar dos anos, foi-se reconhecendo que, dependendo da natureza da doença, autoimunidade, autoinflamação, alergias e malignidades são comuns e, em alguns casos, a manifestação predominante (Fischer et al, 2017). Portanto, para melhor representar a ampla gama de fenótipos associados, foi proposto o novo nome de Erros Inatos da Imunidade (EII). Com o avanço do sequenciamento de nova geração, foi-se identificando que, no nível populacional, os EII advêm de variantes raras, de alto impacto, com alta penetrância, mas que raramente se mostra completa (defeito monogênico, mas não mendeliano). Adicionalmente, em diversas entidades clínicas pertencentes aos EII, existe heterogeneidade alélica levando a uma homogeneidade fenotípica (diversos genes envolvidos em uma mesma via

levando a uma mesma apresentação clínica), tornando os EII um grupo cada vez mais complexo de defeitos genéticos (Casanova, Abel, 2021).

### **1.2.1 Susceptibilidade a infecções virais**

Os números de EII vêm crescendo a cada ano, chegando em 2021 a 485 defeitos monogênicos diferentes reportados pela União Internacional das Sociedades de Imunologia (IUIS, do inglês, *International Union of Immunological Societies*) (Tangye et al., 2020; Tangye et al., 2021). Existem diversas classes de EII, alguns com amplo espectro clínico, como deficiência em moléculas essenciais à imunidade de IFN (como NEMO e *STAT1*), que podem levar a apresentações clínicas diferentes e também infecções por patógenos variados, incluindo infecções fúngicas, bacterianas e virais. Em contraste, existem erros inatos mais restritos, que não afetam a via completa de resposta antiviral e podem ser limitados a susceptibilidade a um tipo específico de patógeno.

Pacientes com mutações em *TLR3* e também em *DBP1* são susceptíveis a infecção específica pelo vírus herpes simplex 1 (HSV-1) com o desenvolvimento de encefalite herpética (Sancho-Shimizu et al., 2011; Zhang SY et al., 2018). Já pacientes com defeitos em *MDA5* e *IRF7* são susceptíveis a infecções respiratórias graves causadas por rinovírus e influenza, respectivamente (Lamborn et al., 2017; Ciancanelli et al., 2015). Defeitos em *MST1* levam a susceptibilidade a EV-HPV (Crequer et al., 2012), e defeitos em RNA polimerase III levam a infecções graves por varicela zoster (Ogunjimi et al., 2017). Além disso, recentemente foi descrito que existem indivíduos jovens e previamente hígidos que desenvolvem COVID-19 grave pois possuem erros em componentes da imunidade de IFN do tipo I (Zhang et al., 2020a). Todas essas moléculas são parte da resposta antiviral de IFN, porém existe redundância nas funções em alguns tipos celulares e a não expressão delas não oblitera a via de sinalização em todos os casos, tornando os defeitos silenciosos até o contato com patógenos específicos.

Além dos defeitos genéticos que levam aos EII, existem outros mecanismos que podem levar a um fenótipo de EII, porém sem a presença do defeito genético esperado, o que configura uma fenocópia. Um desses mecanismos é a presença de autoanticorpos anti-citocinas, que podem contribuir para quadros de imunodeficiência, desregulação imune e autoimunidade (Browne, Holland, 2010; Walter et al., 2015; Barcenas-Morales et al., 2019; Bastard et al., 2020; Bastard et al., 2021). Especificamente quando se fala de susceptibilidade a quadros clínicos graves causados por agentes virais, trabalhos

recentes mostraram associação causal entre autoanticorpos anti-IFN tipo I em aproximadamente 10% dos pacientes com formas graves de COVID-19 (Bastard et al., 2020), assim como pacientes com reações graves à vacina viva atenuada da febre amarela (Bastard et al., 2021). Nos dois casos citados, esses autoanticorpos são pré-existent à doença e contribuem para a gravidade do quadro através de perturbação na imunidade antiviral devido à neutralização de IFN do tipo I, remanescente de pacientes com defeitos autossômicos recessivos no gene *IFNAR1*, que levam à deficiência do receptor de IFN do tipo I (Zhang et al., 2020b).

## 2. JUSTIFICATIVA

Estudos em camundongos infectados por ZIKV deram os primeiros indícios de que a genética do hospedeiro é importante para a infecção, já que apenas linhagens específicas são susceptíveis (Cugola et al., 2016). Em humanos, o amplo espectro de manifestações clínicas dos indivíduos infectados sugere que pode haver um mecanismo genético por trás dos casos com os piores desfechos. O desenvolvimento da SCZ após infecção congênita ocorre apenas em uma pequena parcela dos indivíduos expostos, sugerindo que a infecção durante a gravidez é necessária, mas não determinante para o desenvolvimento da síndrome. Além disso, a grande maioria dos estudos com gêmeos mostraram alta taxa de concordância para SCZ em gêmeos monozigóticos e discordância em gêmeos dizigóticos (Santos et al., 2017; van der Linden et al., 2017; Caires-Júnior et al., 2018; Sobhani et al., 2020; Da Silva et al., 2021), indicando novamente que a genética do hospedeiro deve ser importante. Adicionalmente, dois estudos geraram CPNs e trofoblastos *in vitro* a partir das células de três pares de gêmeos dizigóticos com fenótipos discordantes para a SCZ e verificaram, após infecção com ZIKV, que as células derivadas das crianças afetadas são mais susceptíveis à infecção do que das crianças não afetadas (Caires-Júnior et al., 2018; Amaral et al., 2020), mostrando que há uma diferença entre saudáveis e afetados que é anterior ao vírus.

A maioria dos esforços de investigação da infecção pelo ZIKV centraram-se em relatos de casos clínicos, desenvolvimento de modelos animais, desenvolvimento de vacinas e identificação de novas drogas antivirais. Isso permitiu o aumento do conhecimento sobre as interações vírus-hospedeiro e a patogênese da doença. Embora esses estudos tenham proporcionado avanço significativo em nossa compreensão da biologia do ZIKV, existe uma escassez de informações sobre a variabilidade genética em indivíduos afetados pelo vírus, com trabalhos em sua maioria tentando apontar associação de variantes ao fenótipo da SCZ, porém ainda sem identificação de variantes raras e com predição de patogenicidade e também sem o estabelecimento de associações causais (Rossi et al., 2019; Santos et al., 2019; de O da Silva et al., 2021). Essa percepção é fundamental para avançar a nossa compreensão dos parâmetros imunológicos que contribuem para a imunidade protetora, bem como desfecho sintomático durante a infecção pelo ZIKV.

Baseado na observação de que a variabilidade genética de cada indivíduo pode torná-lo susceptível a um patógeno específico, o presente estudo tem como hipótese que existam variantes genéticas, relacionadas ao sistema imune e à resposta antiviral, que podem estar relacionadas ao SCZ em humanos. Assim, o principal objetivo é a investigação dos mecanismos genéticos do desenvolvimento da Síndrome Congênita do Zika em humanos, através da análise de genes da imunidade de crianças com a Síndrome Congênita do Zika e suas respectivas mães.

### **3. OBJETIVOS**

Investigar variantes genéticas relacionadas a Síndrome Congênita do Zika em humanos.

Foram objetivos específicos:

- a. investigar variantes genéticas diferenciais em quaisquer genes dos infantes expostos ao ZIKV durante a gestação, que desenvolveram ou não a SCZ, com enfoque especial nos genes do sistema imune inato;
- b. investigar variantes genéticas diferenciais quaisquer genes de mulheres que foram infectadas pelo ZIKV durante a gestação cujos filhos desenvolveram ou não a SCZ, com enfoque especial nos genes do sistema imune inato;
- c. Investigar a presença de autoanticorpos anti-IFN do tipo I nos grupos de estudo para verificar a possibilidade de fenocópia de erro inato da imunidade antiviral.

#### **4. CONSIDERAÇÕES FINAIS**

A redução do custo do sequenciamento de nova geração ao longo do tempo tornou esta, uma ferramenta importante e poderosa para a investigação de variantes raras e implicadas em doenças humanas (Manolio et al., 2009), e vem trazendo resultados positivos na investigação de erros inatos da imunidade (Meyts et al., 2016; Arts et al., 2019). É importante pontuar que a metodologia de sequenciamento completo de exoma, que ainda é mais acessível que o sequenciamento completo de genoma, possui algumas limitações: não há resolução forte para investigação de grandes inserções e deleções e CNVs, não há cobertura completa de regiões não codificantes e regiões repetitivas tendem a gerar artefatos de sequenciamento (Meynert et al., 2014; Burdick et al., 2020).

Adicionalmente, atribuir patogenicidade a uma variante rara qualquer não é uma tarefa fácil. Mais de 50% das variantes identificadas nos cromossomos humanos são consideradas raras (Karki et al., 2015; Zhang, 2015). Estudos de genética de populações sugerem que a recente expansão da população humana pode ter resultado em grande número de variantes raras de susceptibilidade a doenças (1000 genomes Project consortium et al., 2015) tornando, portanto, o estudo de tais variantes de extrema relevância. Classificar variantes requer acesso a grandes bancos de dados populacionais, porém diversas populações, estão sub-representadas ou mesmo ausentes (no caso da

brasileira) dos grandes bancos de dados bem consolidados, como GnomAD e 1000genomes. Bancos de dados locais são de grande relevância para identificar variantes raras em dada população, no Brasil temos um banco recente em expansão, ABraOM (Naslavsky et al., 2017) – todas as variantes finais foram checadas neste banco para verificar se eram de fato raras na população brasileira. Outros fatores que interferem na investigação de variantes raras são a penetrância incompleta e heterogeneidade genética, que ocorrem com frequências em doenças humanas e podem ser fatores de confusão em estudos de exoma (Cooper et al, 2013).

Soma-se a isso a questão do conceito de herdabilidade perdida, que propõem que doenças denominadas complexas possuem um mecanismo patogênico que necessita de mais de um ou dois genes afetados na mesma pessoa para desencadeamento de uma doença (Maher, 2008). Neste conceito, presume-se que variantes de baixo risco se somem para gerar o fenótipo, porém a identificação de tais variantes é complexa, pois normalmente são variantes consideradas comuns (com frequências alélicas altas e sem predição de patogenicidade) e para ter robustez analítica é necessário um número amostral na casa dos milhares. Além disso, a herdabilidade perdida ainda leva em consideração o envolvimento de outros fatores não estritamente genéticos, como mecanismos epigenéticos, e influência de fatores ambientais (Visscher et al., 2008 Gibson, 2011).

A identificação da origem genética de um fenótipo específico pode ser complexa, dado que genótipos e fenótipos podem não apresentar relações lineares, o que se deve parcialmente às interações genéticas com papel fundamental no controle da dependência entre genes, ou epistasia, e pode resultar em variabilidade fenotípica (Constanzo et al, 2019). Modificadores genéticos são definidos como variantes genéticas que podem modificar o desfecho fenotípico da variante primária causativa da doença, assim são capazes de aumentar ou diminuir a severidade de uma doença, mas podem não ser suficientes para causa-la individualmente (Rahit et al., 2022). Essa interferência pode ocorrer por diversos mecanismos, como uma interação genética, bioquímica ou funcional com o gene-alvo ou seus produtos (Domingo et al., 2019).

A investigação de genes dos EII em crianças com SCZ e suas respectivas mães identificou variantes em genes que codificam proteínas que interagem com componentes da imunidade antiviral da resposta inflamatória (e.g. *RELA*, *TFNAIP3* e *NFE2L2*), indicando possíveis fatores modificadores que poderiam contribuir para o desenvolvimento da síndrome. Já a análise exploratória de associação de variantes

comuns ao fenótipo de SCZ identificou associação a genes expressos no cérebro (*CNTNAP3* e *FOXD4L6*) no grupo A, o que, somado aos dados de investigação dos EII, pode indicar não há um único gene ou mecanismo capaz de levar à SCZ, mas uma multiplicidade de fatores que podem contribuir em menor ou maior peso para a síndrome.

Até o momento, não existem trabalhos que demonstrem associação causal de variantes genéticas e desenvolvimento de SCZ. Alguns estudos de associação, utilizando genotipagem específica de alguns genes identificaram polimorfismos em TNF- $\alpha$ , TLR-3 e também via de mTOR (Santos et al., 2019; Da Silva et al., 2021), e acusaram associação questionável ao grupo de crianças com SCZ (Barros, Oliveira, 2020), o que seria esperado devido aos diversos vieses envolvidos, como investigação dos genes por meio do uso de sondas específicas e não dos genes inteiros e pequeno número amostral. Além disso, foi possível identificar na literatura apenas um trabalho com objetivo similar ao presente estudo, que visou identificar possíveis variantes genéticas raras e comuns e vias biológicas que pudessem estar associadas ao fenótipo de SCZ a partir do sequenciamento completo e exoma de amostras de crianças expostas ao ZIKV durante o período embrionário, com ou sem a síndrome congênita (Borda et al., 2021). Na análise de variantes raras e patogênicas, Borda e colegas também não identificaram variantes patogênicas que pudesse ser associadas com robustez ao fenótipo da SCZ; em relação às variantes com predição de patogenicidade, não houve sobreposição com os dados discutidos no presente trabalho; adicionalmente, também foi realizada análise de associação, e devido ao baixo número amostral, os autores comentam que não foi possível obter a significância estatística para uma análise típica de associação ( $5 \times 10^{-8}$ ), entretanto discute-se sobre os polimorfismos candidatos a associação com o fenótipo da SCZ, em especial no gene *IL12RB2* - contudo nossos resultados não corroboram os achados de Borda e colegas. A maior limitação de ambos estudos é o tamanho amostral das coortes analisadas, que diminui o poder de detecção de variantes associadas ao fenótipo, os resultados podem ser complementares, e não excludentes e estudos maiores se fazem necessários para a construção de conclusões mais robustas.

Em relação à investigação de potencial fenocópia de erro inato da imunidade antiviral, trabalhos recentes têm mostrado associação causal entre autoanticorpos anti-IFN tipo I e susceptibilidade a infecções virais, como formas graves de COVID-19 (Bastard et al., 2020), e reações graves à vacina viva atenuada da febre amarela (Bastard



et al., 2021). Entretanto, a maioria dos estudos envolve adultos e ainda não existem parâmetros para quais seriam os melhores valores para se considerar neutralização em pacientes pediátricos. A avaliação da presença de autoanticorpos anti-IFN do tipo I conduzida neste trabalho gerou dados interessantes sobre o possível papel da presença de autoanticorpos no desenvolvimento da SCZ, em especial de anti-IFN- $\alpha$  no indivíduo 102A, contudo futuros estudos se fazem necessários para validação funcional e elucidção da importância deste fenômeno na patogênese da SCZ.

Desde o início do surto de Zika nas Américas em 2015, e da subsequente descrição da Síndrome Congênita do Zika, a comunidade científica se debruçou sobre a virologia, epidemiologia, clínica e patogênese da infecção pelo ZIKV. Após 7 anos de extensa pesquisa, entendemos muito mais sobre a patogênese da infecção, porém muitas questões permanecem sem resposta. Infecções no período pré-natal são complexas, e diversos fatores podem influenciar os desfechos, como a fase do período embrionários em que ocorre a exposição, a virulência do patógeno, fatores ambientais e genéticos e a própria resposta imunológica do hospedeiro. O presente estudo teve como objetivo auxiliar a preencher a lacuna de quais podem ser os fatores genéticos do hospedeiro que influenciam ou definem o desenvolvimento da SCZ. Os resultados aqui apresentados delinearão fatores que podem contribuir para os piores desfechos, dados que podem contribuir para futuros estudos funcionais. Com isso, espera-se contribuir para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para prevenir a infecção, ou interferir em seus desfechos.

## 5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

- 1000 Genomes Project Consortium, et al. A global reference for human genetic variation. *Nature*. 2015; Oct 1;526(7571):68-74. doi: 10.1038/nature15393.
- Abbink P, Larocca RA, De La Barrera RA, et al.: Protective efficacy of multiple vaccine platforms against Zika virus challenge in rhesus monkeys. *Science*. 2016; 353(6304): 1129–32.
- Abel L, Plancoulaine S, Jouanguy E, Zhang SY, Mahfoufi N, et al. Age-dependent Mendelian predisposition to herpes simplex virus type 1 encephalitis in childhood. *J. Pediatr*. 2010; 157:623–629.
- Adzhubei IA, Schmidt S, Peshkin L, Ramensky VE, Gerasimova A, Bork P, et al. A method and server for predicting damaging missense mutations. *Nat Methods*. 2010; 7(4):248-249.
- Aggarwal A, Rodriguez-Buritica DF, Northrup H. Wiedemann-Steiner syndrome: Novel pathogenic variant and review of literature. *European Journal of Medical Genetics*. 2017;60(6): 285–288.
- Al Sheikh E, Arkwright PD, Herwadkar A, Hussell T, Briggs TA. TCF3 Dominant Negative Variant Causes an Early Block in B-Lymphopoiesis and Agammaglobulinemia. *J Clin Immunol*. 2021; 41, 1391–1394. <https://doi.org/10.1007/s10875-021-01049-9>
- Aliota MT, Caine EA, Walker EC, Larkin KE, Camacho E, Osorio JE. Characterization of lethal Zika virus infection in AG129 mice. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004682
- Amaral MS, Goulart E, Caires-Júnior LC, Morales-Vicente DA, Soares-Schanoski A, Gomes RP, et al. Differential gene expression elicited by ZIKV infection in trophoblasts from congenital Zika syndrome discordant twins. *PLoS Negl Trop Dis*. 2020; 14(8): e0008424. Doi: 10.1371/journal.pntd.0008424
- Ameratunga R, Koopmans W, Woon ST, Leung E, Lehnert K, Slade CA, et al. Epistatic interactions between mutations of TAC1 (TNFRSF13B) and TCF3 result in a severe primary immunodeficiency disorder and systemic lupus erythematosus. *Clin Transl Immunol*. 2017;6:e159.
- Anderson CA, Pettersson FH, Clarke GM, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Data quality control in genetic case-control association studies. *Nat Protoc*. 2010 Sep;5(9):1564-73. doi: 10.1038/nprot.2010.116.

---

<sup>1</sup> De acordo com o estilo Vancouver

Arber C, Lovejoy C, Harris L, Willumsen N, Alatza A, Casey JM, et al. Familial Alzheimer's Disease Mutations in PSEN1 Lead to Premature Human Stem Cell Neurogenesis. *Cell Rep.* 2021 Jan 12;34(2):108615. doi: 10.1016/j.celrep.2020.108615.

Artavanis-Tsakonas S, Rand MD, Lake RJ. Notch signaling: cell fate control and signal integration in development. *Science.* 1999;284:770–6.

Arts P, Simons A, AlZahrani MS, et al. Exome sequencing in routine diagnostics: a generic test for 254 patients with primary immunodeficiencies. *Genome Medicine.* 2019;11:38 <https://doi.org/10.1186/s13073-019-0649-3>

Asano T, Boisson B, Onodi F, Matuozzo D, Moncada-Velez M, Maglorius Renkilaraj MRL, et al. X-linked recessive TLR7 deficiency in ~1% of men under 60 years old with life-threatening COVID-19. *Sci Immunol.* 2021 Aug 19;6(62):eabl4348. doi: 10.1126/sciimmunol.abl4348.

Aubry, M., Finke, J., Teissier, A., Roche, C., Brout, J., Paulous, S., et al. Seroprevalence of arboviruses among blood donors in French Polynesia, 2011–2013. *Int J Infect Dis* 2015; 41, 11–12.

Azevedo RSS, De Sousa JR, Araujo MTF, Filho AJM, De Alcantara BN, Araujo FMC, et al. In situ immune response and mechanisms of cell damage in central nervous system of fatal cases microcephaly by Zika virus. *Sci. Rep.* 2018, 8, 1.

Badran YR, Dedeoglu F, Leyva Castillo JM, Bainter W, Ohsumi TK, Bousvaros A, et al. Human RELA haploinsufficiency results in autosomal-dominant chronic mucocutaneous ulceration. *J. Exp. Med.* 2017; 214: 1937-1947.

Baer S, Afejar A, Smol T, Piton A, Gérard B, Alembik Y, et al. Wiedemann-Steiner syndrome as a major cause of syndromic intellectual disability: A study of 33 French cases. *Clin Genet.* 2018 Jul; 94(1):141-152.

Ballew BJ, Joseph V, De S, Sarek G, Vannier JB, Stracker T, et al. A recessive founder mutation in regulator of telomere elongation helicase 1, RTEL1, underlies severe immunodeficiency and features of Hoyeraal Hreidarsson syndrome. *PLoS Genet.* 2013; Aug;9(8):e1003695.

Barcenas-Morales G, Cortes-Acevedo P, Doffinger R. Anticytokine autoantibodies leading to infection: early recognition, diagnosis and treatment options. *Curr Opin Infect Dis* 2019, 32:330–336. 10.1097/QCO.0000000000000561

Barros PVM, Oliveira JRM. Exploring the Genetic Predisposition to Zika Virus Congenital Syndrome. *J Infec Dis.* 2020; 222(6):1062–1063. <https://doi.org/10.1093/infdis/jiaa038>

Barzon L, Pacenti M, Franchin E, Lavezzo E, Trevisan M, Sgarabotto D, et al. Infection dynamics in a traveller with persistent shedding of Zika virus RNA in semen for six months after returning from Haiti to Italy, January 2016. *Euro Surveill* 2016;21:30316.

Bastard P, Gervais A, Le Voyer T, Rosain J, Philippot Q, Manry J, et al. Autoantibodies neutralizing type I IFNs are present in ~ 4% of uninfected individuals over 70 years old and account for ~ 20% of COVID-19 deaths. *Sci Immunol.* 2021a; Aug 19;6(62):eabl4340. doi: 10.1126/sciimmunol.abl4340.

Bastard P, Michailidis E, Hoffmann HH, et al. Auto-antibodies to type I IFNs can underlie adverse reactions to yellow fever live attenuated vaccine. *J Exp Med.* 2021b Apr 5;218(4):e20202486. doi: 10.1084/jem.20202486.

Bastard P, Rosen LB, Zhang Q, et al. Autoantibodies against type I IFNs in patients with life-threatening COVID-19. *Science.* 2020 Oct 23;370(6515):eabd4585. doi: 10.1126/science.abd4585. Epub 2020 Sep 24.

Bayer A, Lennemann NJ, Ouyang Y, Bramley JC, Morosky S, Marques ET, Jr., et al. Type III interferons produced by human placental trophoblasts confer protection against Zika virus infection. *Cell Host Microbe* 2016;19:705-12.

Bearn, AG. Archibald Garrod and the Individuality of Man. Oxford, UK: Clarendon; 1993. p. 227

Ben-Ali M, Yang J, Chan KW, Ben-Mustapha I, Mekki N, Benabdeselem C, et al. Homozygous transcription factor 3 gene (TCF3) mutation is associated with severe hypogammaglobulinemia and B-cell acute lymphoblastic leukemia. *J Allergy Clin Immunol.* 2017;140(4):1191–4 e4. <https://doi.org/10.1016/j.jaci.2017.04.037>

Ben-Chetrit E, Touitou I. Familial Mediterranean Fever in the world. *Arthritis Rheum.* 2009; 61:1477-53.

Bertin J, Wang L, Guo Y, et al. CARD11 and CARD14 are novel caspase recruitment domain (CARD)/membrane-associated guanylate kinase (MAGUK) family members that interact with BCL10 and activate NF-kappa B. *J. Biol. Chem.*, 276 (2001), pp. 11877-11882

Besnard M, Lastere S, Teissier A, Cao-Lormeau V, Musso D. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Euro Surveill* 2014;19:20751.

Best SM, Mitzel DN, Bloom ME. Action and reaction: The arthropod-borne flaviviruses and host interferon responses. *Future Virology* 2006;1:447-59.

Bigorgne AE, Farin HF, Lemoine R, Mahlaoui N, Lambert N, Gil M, et al. TTC7A mutations disrupt intestinal epithelial apical polarity. *J Clin Invest.* 2014;124(1):328-37.

Boisson B, Wang YD, Bosompem A, et al. A recurrent dominant negative E47 mutation causes agammaglobulinemia and BCR- B cells. *J Clin Invest*. 2013;123(11):4781–4785. doi:10.1172/JCI71927

Bonaldo MC, Ribeiro IP, Lima NS, Dos Santos AA, Menezes LS, da Cruz SO, et al. Isolation of infective Zika virus from urine and saliva of patients in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004816.

Bonds JA, Kuttner-Hirshler Y, Bartolotti N, Tobin MK, Pizzi M, Marr R, et al. Presenilin-1 Dependent Neurogenesis Regulates Hippocampal Learning and Memory. *PLoS ONE*. 2015; 10(6): e0131266. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0131266>

Booty MG, Chae JJ, Masters SL, Remmers EF, Barham N, Le JM, et al. Familial Mediterranean Fever with a single MEFV mutation: is there a second hit? *Arthritis & Rheumatism*. *J Am Col Rheumatol*. 2009;60:1862-6.

Borda V, da Silva Francisco Junior R, Carvalho JB, et al. Whole-Exome Sequencing Reveals Insights into Genetic Susceptibility to Congenital Zika Syndrome. *PLoS Negl. Trop. Dis*. 2021, 15, e0009507.

Bowen JR, Quicke KM, Maddur MS, O'Neal JT, McDonald CE, Fedorova NB, et al. Zika virus antagonizes type I interferon responses during infection of human dendritic cells. *PLoS Pathog*. 2017a;13:e1006164.

Bowen JR, Zimmerman MG, Suthar MS. Taking the defensive: immune control of the Zika virus infection. *Virus Research*. 2017b. <https://doi.org/10.1016/j.virusres.2017b.08.018>.

Bralten LB, Gravendeel AM, Kloosterhof NK, et al. The CASPR2 cell adhesion molecule functions as a tumor suppressor gene in glioma. *Oncogene*. 2010;29:6138–6148.

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 15;375(24):2321-2334. doi: 10.1056/NEJMoa1602412.

Brasil P, Sequeira PC, Freitas AD, Zogbi HE, Calvet GA, De Souza RV, et al. Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus infection. *Lancet* 2016a, 387, 1482.

Brookes AJ. The essence of SNPs. *Gene*. 1999;234:177–86.

Broutet N, Krauer F, Riesen M, Khalakdina A, Almiron M, Aldighieri S, et al. Zika virus as a cause of neurologic disorders. *N Engl J Med*. 2016;374:1506–9.

Browne, S.K.; Holland, S.M. Immunodeficiency secondary to anticytokine autoantibodies. *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol*. 2010, 10, 534–541.

Burdick KJ, Cogan JD, Rives LC, Robertson AK, Koziura ME, Brokamp E, et al. Limitations of exome sequencing in detecting rare and undiagnosed diseases. *Am J Med Genet A*. 2020 Jun;182(6):1400-1406. doi: 10.1002/ajmg.a.61558.

Caires-Júnior LC, Goulart E, Melo US, Araujo BHS, Alvizi L, Soares-Schanoski A, et al. Discordant congenital Zika syndrome twins show differential in vitro viral susceptibility of neural progenitor cells. *Nat Commun*. 2018 Feb 2;9(1):475.

Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerg Infect Dis* 2015; 21:1885–1886.

Cao-Lormeau, V. M., Roche, C., Teissier, A., Robin, E., Berry, A. L., Mallet, H. P., et al. Zika virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 2014; 20, 1085.

Carter-Timofte ME, Hansen AF, Christiansen M, Paludan SR, Mogensen TH. Mutations in RNA Polymerase III genes and defective DNA sensing in adults with varicella-zoster virus CNS infection. *Genes Immun*. 2019 Mar;20(3):214-223. doi: 10.1038/s41435-018-0027-y.

Casanova JL, Abel L. Primary immunodeficiencies: a field in its infancy. *Science*. 2007; 317:617–619.

Casanova JL, Abel L. The Genetic Theory of Infectious Diseases: A Brief History and Selected Illustrations. *Annual review of genomics and human genetics*. 2013;14:215-243. doi:10.1146/annurev-genom-091212-153448.

Casanova JL. Human genetic basis of interindividual variability in the course of infection. *PNAS*. 2015; 112:E7118–27.

Catalano PM. The impact of gestational diabetes and maternal obesity on the mother and her offspring. *J. Dev. Origins Health Disease*. 2010; 1:208-215. Doi: 10.1017/S2040174410000115

Cerbino-Neto J, Mesquita EC, Souza TML, Parreira V, Wittlin BB, Durovni B, et al. Clinical manifestations of Zika virus infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015. *Emerg Infect Dis*. 2016; 22(7):1318–1320. <https://doi.org/10.3201/eid2207.160375>

Chae JJ, Komarow HD, Cheng J, Wood G, Raben N, Liu PP, et al. Targeted disruption of pyrin, the FMF protein, causes heightened sensitivity to endotoxin and a defect in macrophage apoptosis. *Mol Cell*. 2003 Mar;11(3):591-604. doi: 10.1016/s1097-2765(03)00056-x

Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol* 1990;44:649-88.

Chaudhary V, Yuen KS, Chan JF, Chan CP, Wang PH, Cai JP, et al. Selective activation of type II interferon signaling by Zika virus NS5 protein. *J Virol* 2017;91:e00163-17

Chiu YH, Macmillan JB, Chen ZJ. RNA polymerase III detects cytosolic DNA and induces type I interferons through the RIG-I pathway. *Cell*. 2009;138(3):576–591.

Ciancanelli MJ, Huang SX, Luthra P, Garner H, Itan H, Volpi S, et al. Life-threatening influenza and impaired interferon amplification in human IRF7 deficiency. *Science*. 2015; 348(6233): 448-453.

Cingolani P, Platts A, Wang le L, Coon M, Nguyen T, Wang L, et al. A program for annotating and predicting the effects of single nucleotide polymorphisms, SnpEff: SNPs in the genome of *Drosophila melanogaster* strain w1118; iso-2; iso-3. *Fly (Austin)*. 2012 Apr-Jun;6(2):80-92. doi: 10.4161/fly.19695.

Clarke GM, Anderson CA, Pettersson FH, Cardon LR, Morris AP, Zondervan KT. Basic statistical analysis in genetic case-control studies. *Nat Protoc*. 2011 Feb;6(2):121-33. doi: 10.1038/nprot.2010.182.

Coffey AJ, Brooksbank RA, Brandau O, et al. Host response to EBV infection in X-linked lymphoproliferative disease results from mutations in an SH2-domain encoding gene. *Nat Genet*. 1998; 20:129-135

Cogan JD, Kropski JA, Zhao M, Mitchell DB, Rives L, Markin C, et al. Rare variants in RTEL1 are associated with familial interstitial pneumonia. *Am. J. Resp. Crit. Care Med*. 2015; 191:646-655.

Conley ME, Broides A, Hernandez-Trujillo V, et al. Genetic analysis of patients with defects in early B-cell development, *Immunol. Rev*. 203 (2005) 216–234 (Epub 2005/01/22).

Costanzo M, Kuzmin E, van Leeuwen J, et al. Global Genetic Networks and the Genotype-to-Phenotype Relationship. *Cell* 2019, 177, 85–100.

Cooper DN, Krawczak M, Polychronakos C, Tyler-Smith C, Kehrer-Sawatzki H. Where genotype is not predictive of phenotype: towards an understanding of the molecular basis of reduced penetrance in human inherited disease. *Hum Genet*. 2013 Oct;132(10):1077-130. doi: 10.1007/s00439-013-1331-2.

Corry J, Arora N, Good CA, Sadovsky Y, Coyne CB. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal-fetal interface. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2017;114:9433-8.

Crequer A, Picard C, Patin E, D’Amico A, Abhyankar A, Munzer M et al. Inherited MST1 deficiency underlies susceptibility to EV-HPV infections. *PLoS ONE*. 2012; 7(8):e44010. doi:10.1371/journal.pone.0044010

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; 534, 267–271.

Da Silva LRO, Oliveira P, Sardi S, Soares G, Bandeira AC, Costa RS, et al. Zika Virus Congenital Syndrome and MTOR gene variants: insights from a family of dizygotic twins. *Heliyon* 7. 2021; e06878. <https://doi.org/10.1016/j.heliyon.2021.e06878>

Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, et al. Zika virus depletes neural progenitors in human cerebral organoids through activation of the innate immune receptor TLR3. *Cell Stem Cell*. 2016; 19:258–265.

de O da Silva LR, Oliveira P, Sardi S, Soares G, Bandeira AC, Costa RDS, et al. Zika Virus Congenital Syndrome and MTOR gene variants: insights from a family of dizygotic twins. *Heliyon*. 2021 Apr 22;7(4):e06878. doi: 10.1016/j.heliyon.2021.e06878.

de Sousa JR, Azevedo R., Martins Filho AJ, de Araujo MTF, Cruz E, Vasconcelos BCB, 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. <https://doi.org/10.1016/j.cyto.2018.08.008>.

Deng Z, Glousker G, Molczan A, Fox AJ, Lamm N, Dheekollu J, et al. Inherited mutations in the helicase RTEL1 cause telomere dysfunction and Hoyeraal-Hreidarsson syndrome. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013; 110,E3408–E3416.

Diagne, C. T., Diallo, D., Faye, O., Ba, Y., Faye, O., Gaye, et al. Potential of selected Senegalese *Aedes* spp. mosquitoes (Diptera: Culicidae) to transmit Zika virus. *BMC Infect Dis* 2015; 15, 492.

DiCandia F, Fontana P, Paglia P, Falco M, Rosao C, Piscopo C, et al. Clinical heterogeneity of Kabuki syndrome in a cohort of Italian patients and review of the literature. *European Journal of Pediatrics*. 2021 Jul 7. <https://doi.org/10.1007/s00431-021-04108-w>

Dick GW, Kitchen SF, Haddow AJ. Zika virus. I. Isolations and serological specificity. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 1952;46:509-20

Ding Q, Gaska JM, Douam F, Wei L, Kim D, Balev M, et al. Species-specific disruption of STING-dependent antiviral cellular defenses by the Zika virus NS2B3 protease. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2018 Jul 3;115(27):E6310-E6318. doi: 10.1073/pnas.1803406115.

Domingo J, Baeza-Centurion P, Lehner B. The Causes and Consequences of Genetic Interactions (Epistasis). *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet*. 2019, 20, 433–460.

Dos Santos T, Rodriguez A, Almiron M, Sanhueza A, Ramon P, De Oliveira WK, et al. Zika Virus and the Guillain-Barré Syndrome—Case Series from Seven Countries. *N. Engl. J. Med*. 2016, 375, 1598–1601.

Dowall SD, Graham VA, Rayner E, Atkinson B, Hall G, Watson RJ, et al. A susceptible mouse model for Zika virus infection. *PLoS Negl Trop Dis* 2016;10:e0004658

Duarte G, Marcolin AC, Gonçalves CV, Quintana SM, Berezowski AT, Nogueira AA, et al. Infecção urinária na gravidez: análise dos métodos para diagnóstico e do tratamento. *Rev Bras Ginecol Obstet.* 2002; 24(7):471-477. doi.org/10.1590/S0100-72032002000700007

Dudley DM, Aliota MT, Mohr EL, Newman CM, Golos TG, Friedrich TC, O'Connor DH. Using macaques to address critical questions in Zika virus research. *Annu Rev Virol.* 2019; 6, 481–500. doi: 10.1146/annurev-virology-092818-015732.

Duffy MR, Chen TH, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *N Engl J Med* 2009;360:2536-43.

Dupont-Rouzeyrol M, O'Connor O, Calvez E, Daures M, John M, Grangeon JP, et al. Co-infection with Zika and dengue viruses in 2 patients, New Caledonia, 2014. *Emerg Infect Dis* 2015;21:381-2.

ECDC. Zika Virus Epidemic in the Americas: Potential Association with Microcephaly and Guillain-Barre Syndrome. Stockholm: European Centre for Disease Prevention and Control. 2015. <http://ecdc.europa.eu/en/publications/Publications/zika-virus-americasassociation-with-microcephaly-rapid-risk-assessment.pdf>

Edri R, Yaffe Y, Ziller MJ, Mutukula N, Volkman R, David E, et al. Analysing human neural stem cell ontogeny by consecutive isolation of Notch active neural progenitors. *Nat Commun.* 2015 Mar 23;6:6500. doi: 10.1038/ncomms7500.

Elong Ngonu A, Vizcarra EA, Tang WW, Sheets N, Joo Y, Kim K et al. Mapping and role of the CD8+ T cell response during primary Zika virus infection in mice. *Cell Host Microbe* 2017; 21:35–46.

Fagbami A. Epidemiological investigations on arbovirus infections at Igbo-Ora, Nigeria. *Trop Geogr Med.* 1977;29:187–91.

Fan Y, Newman T, Linardopoulou E, Trask BJ. Gene content and function of the ancestral chromosome fusion site in human chromosome 2q13-2q14.1 and paralogous regions. *Genome Res.* 2002;12:1663–1672. doi: 10.1101/gr.338402.

Fayard J, Collardeau S, Bertrand Y, Cordier MP, Malcus C, Dubois R, et al. TTC7A mutation must be considered in patients with repeated intestinal atresia associated with early inflammatory bowel disease: Two new case reports and a literature review. *Arch Pediatr.* 2018. Jun 16;S0929-693X(18)30112-X. doi: 10.1016/j.arcped.2018.05.006.

Fensterl V, Sen GC. Interferons and viral infections. *Biofactors* 2009;35:14-20.

Fernandez I, Patey N, Marchand V, et al. Multiple intestinal atresia with combined immune deficiency related to TTC7A defect is a multiorgan pathology: A study of a French-Canadian-based cohort. *Medicine.* 2014;93(29):e327.

Ferreira MLB, de Brito CAA, de Oliveira França RF, Moreira ÁJP, de Moraes Machado MÍ, da Paz Melo R, et al. Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: A prospective observational study. *Lancet Neurol.* 2020, 19, 826–839.

Filipovich AH. Hemophagocytic lymphohistiocytosis (HLH) and related disorders. *Hematology.* (2009) 2009:127–31. doi: 10.1182/asheducation-2009.1.127

Fischer A, Provot J, Jais J-P, Alcais A, Mahlaoui N; members of the CEREDIH French PID study group, Autoimmune and inflammatory manifestations occur frequently in patients with primary immunodeficiencies. *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017; 140, 1388–1393.e8.

Foy BD, Kobylinski KC, Chilson Foy JL, et al. Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 2011; 17:880–882.

França GVA, Schuler-Faccini L, Oliveira WK, Henriques CMP, 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; 388:891–897. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30902-3](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30902-3)

Freitas DA, Souza-Santos R, Carvalho LMA, Barros WB, Neves LM, Brasil P, et al. Congenital Zika syndrome: A systematic review. *PLoS ONE.* 2020; 15(12): e0242367. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0242367>

Frumence, E., Roche, M., Krejbich-Trotot, P., El-Kalamouni, C., Nativel, B., Rondeau, et al. The South Pacific epidemic strain of Zika virus replicates efficiently in human epithelial A549 cells leading to IFN-β production and apoptosis induction. *Virology.* 2016; 493: 217–226. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2016.03.006>

Furtado JM, Esposito DL, Klein TM, Teixeira-Pinto T, da Fonseca BA. Uveitis associated with Zika virus infection. *N Engl J Med* 2016;375:394-6

Gadoury-Levesque V, Dong L, Su R, Chen J, Zhang K, Risma KA, et al Frequency and spectrum of disease-causing variants in 1892 patients with suspected genetic HLH disorders. *Blood Adv.* 2020;4(12):2578-94.

Gambino F Jr, Tai W, Voronin D, Zhang Y, Zhang X, Shi J, et al. A vaccine inducing solely cytotoxic T lymphocytes fully prevents Zika virus infection and fetal damage. *Cell Rep.* 2021 May 11;35(6):109107. doi: 10.1016/j.celrep.2021.109107.

Garcez PP, Loiola EC, Madeiro da Costa R, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, et al. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science.* 2016; 352:816–818.

Gibson G. Rare and common variants: twenty arguments. *Nat. Rev. Genet.* 2011;13, 135–145.

Grant A, Ponia SS, Tripathi S, Balasubramaniam V, Miorin L, Sourisseau M, et al. Zika virus targets human STAT2 to inhibit type I interferon signaling. *Cell Host Microbe* 2016;19:882-90.

Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Ondo MS, Jiolle D, et al. Zika virus in Gabon (Central Africa) - 2007: A new threat from *Aedes albopictus*? *PLoS Negl. Trop. Dis.* 2014, 8, e2681.

Grubaugh ND, Ishtiaq F, Setoh YX, Ko AI. Misperceived risks of Zika-related microcephaly in India. *Trends Microbiol.* 2019;27:381-3.

Haddow AJ, Williams MC, Woodall JP, et al. Twelve isolations of Zika virus from *Aedes* (*Stegomyia*) *africanus* (Theobald) taken in and above a Uganda forest. *Bull World Health Organ* 1964; 31: 57-69.

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;89:8880-96.

Handler M, Yng X, Shen J. Presenilin-1 regulates neuronal differentiation during neurogenesis. *Development.* 2000; 127 (12): 2593–2606. doi.org/10.1242/dev.127.12.2593

Hasan SS, Sevvana M, Kuhn RJ and Rossmann MG. Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. *Nat Struct Mol Biol.* 2018 Jan;25(1):13-20.

Hastings AK, Yockey LJ, Jagger BW, Hwang J, Uraki R, Gaitsch HF, et al. TAM Receptors Are Not Required for Zika Virus Infection in Mice. *Cell Rep.* 2017, 19, 558–568.

Hennessey M, Fischer M, Staples JE: Zika Virus Spreads to New Areas – Region of the Americas, May 2015-January 2016. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* 2016; 65(3): 55–8.

Hentgen B, GRateau G, Stankovic-Stojanovic K, et al. Familial Mediterranean Fever in heterozygotes: are we able to accurately diagnose the disease in very young children? *Arthritis Reum juin.* 2013;65(6):1654-62.

Hertzog J, Dias Junior AG, Rigby RE, Donald CL, Mayer A, Sezgin E, et al. Infection with a brazilian isolate of zika virus generates rig-i stimulatory rna and the viral ns5 protein blocks type i ifn induction and signaling. *Eur. J. Immunol.* 2018, 48, 1120–1136

Hill S, Vasconcelos J, Neto Z, et al. Emergence of the Zika virus Asian lineage in Angola. *Lancet Inf Dis.* 2019; Oct;19(10):1138-1147. doi: 10.1016/S1473-3099(19)30293-2.

Hirata H, Takahashi A, Shimoda Y, Koide T. Caspr3-deficient mice exhibit low motor learning during the early phase of the accelerated rotarod task. *PLoS One.* 2016a;11:e0147887.

Hirata H, Umemori J, Yoshioka H, et al. Cell adhesion molecule contactin-associated protein 3 is expressed in the mouse basal ganglia during early postnatal stages. *J Neurosci Res.* 2016b;94:74–89.

Hoën B, Schaub B, Funk AL, Ardillon V, Boullard M, Cabié A, et al. Pregnancy Outcomes after ZIKV Infection in French Territories in the Americas. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378, 985–994.

Huang H, Li S, Zhang Y, Han X, Jia B, Liu H et al. CD8+ T cell immune response in immunocompetent mice during Zika virus infection. *J Virol* 2017; 91:Pii: e00900-17.

Huppke P, Weissbach S, Church JA, Schnur R, Krusen M, Dreha-Kulaczewski S, et al. Activating de novo mutations in NFE2L2 encoding NRF2 cause a multisystem disorder. *Nature Commun.* 2017; 8: 818.

Ioos S, Mallet HP, Leparac Goffart I, et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Med Mal Infect* 2014; 44: 302-7.

Itoh K, Takahashi S, Ishii T, Igarashi K, Katoh Y, Oyake T, et al. An Nrf2/small Maf heterodimer mediates the induction of phase II detoxifying enzyme genes through antioxidant response elements. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1997; 236, 313–322.

Jackson BC, Carpenter C, Nebert DW, Vasiliou V. Update of human and mouse forkhead box (FOX) gene families. *Hum Genomics.* 2010 Jun;4(5):345-52. doi: 10.1186/1479-7364-4-5-345.

Jagger BW, Miner JJ, Cao B, Arora N, Smith AM, Kovacs A, et al. Gestational stage and IFN-lambda signaling regulate ZIKV infection In utero. *Cell Host Microbe* 2017;22:366-76 e3.

Jan C, Languillat G, Renaudet J, Robin Y. A serological survey of arboviruses in Gabon [in French]. *Bull Soc Pathol Exot Filiales.* 1978;71:140–6

Jayaraman D, Bae B-I, Walsh CA. The Genetics of Primary Microcephaly. *Annu. Rev. Genom. Hum. Genet.* 2018. 19:177–200.https://doi.org/10.1146/annurev-genom-083117-021441

Jordan CT, Cao L, Roberson EDO et al. Rare and Common Variants in CARD14, Encoding an Epidermal Regulator of NF-kappaB, in Psoriasis. *Am. J. Hum. Genet.*, 90 (2012), 10.1016/j.ajhg.2012.03.013

Jouannic JM, Friszer S, Leparac-Goffart I, Garel C, Eyrolle-Guignot D. Zika virus infection in French Polynesia. *Lancet* 2016;387:1051-2.

Jude CD, Climer L, Xu D, Artinger E, Fisher JK, Ernst P. Unique and independent roles for MLL in adult hematopoietic stem cells and progenitors. *Cell Stem Cell*. 2007; 1:324-337.

Karki R, Pandya D, Elston RC, Ferlini C. Defining “mutation” and “polymorphism” in the era of personal genomics. *BMC Med Genomics*. 2015; 15:8-37. doi: 10.1186/s12920-015-0115-z.

Kawai T, Akira S. Toll-like receptors and their crosstalk with other innate receptors in infection and immunity. *Immunity*. 2011; 34:637-650. doi: 716 10.1016/j.immuni.2011.05.006

Khaiboullina SF, Uppal T, Sarkar R, Gorzalski A, St Jeor S, Verma SC. ZIKV infection regulates inflammasomes pathway for replication in monocytes. *Sci. Rep.* 2017; 7 (1), 16050. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-16072-3>.

Kim K, Seong MW, Chung WH, Park SS, Leem S, Park W, et al. Effect of Next-Generation Exome Sequencing Depth for Discovery of Diagnostic Variants. *Genomics Inform*. 2015 Jun;13(2):31-9. doi: 10.5808/GI.2015.13.2.31.

Kindhauser MK, Allen T, Frank V, Santhana RS, Dye C. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. *Bull World Health Organ* 2016;94:675-86C.

Kobayashi M, Yamamoto M. Nrf2-Keap1 regulation of cellular defense mechanisms against electrophiles and reactive oxygen species. *Adv. Enzyme Regul.* 2006; 46, 113–140.

Kosmicki JA, Churchhouse CL, Rivas MA, Neale BM. Discovery of rare variants for complex phenotypes. *Hum Genet*. 2016 Jun;135(6):625-34. doi: 10.1007/s00439-016-1679-1.

Kumar A, Hou S, Airo AM, Limonta D, Mancinelli V, Branton W, et al. Zika virus inhibits type-I interferon production and downstream signaling. *EMBO Rep* 2016;17:1766-75

Kumar P, Henikoff S, Ng PC. Predicting the effects of coding non-synonymous variants on protein function using the SIFT algorithm. *Nat Protoc*. 2009;4(7):1073-81.

Lambertini L, Diplas AI, Lee MJ, et al. A sensitive functional assay reveals frequent loss of genomic imprinting in human placenta. *Epigenetics*. 2008 Sep;3(5):261-9. doi: 10.4161/epi.3.5.6755. Epub 2008 Sep 7.

Lamborn IT, Jing H, Zhang Y, Drutman SB, Abbott JK, Munir S, et al. Recurrent rhinovirus infections in a child with inherited MDA5 deficiency. *J. Exp. Med.* 2017; 214(7): 1949-72.

Lan PT, Quang LC, Huong VTQ, et al. Fetal Zika virus infection in Vietnam. *PLOS Curr Outbr.* 2017; doi: 10.1371/currents.outbreaks.1c8f631e0ef8cd7777d639eba48647fa.

Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Velez JO, Lambert AJ, Johnson AJ, et al. Genetic and serologic properties of Zika virus associated with an epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerg Infect Dis* 2008;14:1232-9.

Larocca RA, Abbink P, Peron JP, et al.: Vaccine protection against Zika virus from Brazil. *Nature*. 2016; 536(7617): 474–8.

Lazar HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, et al. A mouse model of Zika virus pathogenesis. *Cell Host Microbe* 2016;19:720-30.

Lee CYP, Ng LFP. Zika virus: from obscurity to priority. *Microbes and Infection*. 2018. Mar 9. pii: S1286-4579(18)30069-8. doi: 10.1016/j.micinf.2018.02.009.

Li C, Xu D, Ye Q, Hong S, Jiang Y, Liu X, et al. Zika virus disrupts neural progenitor development and leads to microcephaly in mice. *Cell Stem Cell*. 2016(b). 19, 120–126.

Li H, Durbin R. Fast and accurate short read alignment with Burrows–Wheeler transform. *Bioinformatics*, 2009a, 25(14): 1754-1760.

Li H, Handsaker B, Wysoker A, et al. The sequence alignment/map format and SAMtools. *Bioinformatics*, 2009b, 25(16): 2078-2079.

Li H, Saucedo-Cuevas L, Shresta S, Gleeson JG. The neurobiology of Zika virus. *Neuron*. 2016(a); 92:949-58.

Li T, Wernersson R, Hansen RB, Horn H, Mercer J, Slodkovicz G, et al. A scored human protein-protein interaction network to catalyze genomic interpretation. *Nat Methods*. 2017 Jan;14(1):61-64. doi: 10.1038/nmeth.4083.

Li W, Li N, Dai S, Hou G, Guo K, Chen X, et al. Zika virus circumvents host innate immunity by targeting the adaptor proteins MAVS and MITA. *FASEB J*. 2019; 33(9):9929-9944. doi: 10.1096/fj.201900260R.

Liang Q, Luo Z, Zeng J, Chen W, Foo SS, Lee SA, et al. Zika Virus NS4A and NS4B Proteins Deregulate Akt-mTOR Signaling in Human Fetal Neural Stem Cells to Inhibit Neurogenesis and Induce Autophagy. *Cell Stem Cell*. 2016. Nov 3;19(5):663-671. doi: 10.1016/j.stem.2016.07.019

Lin HZ, Tambyah PA, Yong EL, Biswas A, Chan SY. A review of Zika virus infections in pregnancy and implications for antenatal care in Singapore. *Singapore Med J*. 2017 Apr; 58(4):171-178.

Lindenbach BD and Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Advances in Virus Research*, vol. 59, pp. 23–61, 2003.



Liu S, DeLalio LJ, Isakson BE, Wang TT. AXL-mediated productive infection of human endothelial cells by Zika virus. *Circ. Res.* 2016; 119, 1183–1189. <http://dx.doi.org/10.1161/CIRCRESAHA.116.309866>.

Loo YM, Gale MJr. Immune signaling by RIG-I-like receptors. *Immunity.* 2011; 34:680-692. doi: 10.1016/j.immuni.2011.05.003.

Lundberg, R.; Melén, K.; Westenius, V.; Jiang, M.; Österlund, P.; Khan, H.; Vapalahti, O.; Julkunen, I.; Kakkola, L. Zika virus non-structural protein ns5 inhibits the rig-i pathway and interferon lambda 1 promoter activation by targeting ikk epsilon. *Viruses* 2019, 11, 1024.

Lustig Y, Mendelson E, Paran N, Melamed S, Schwartz E. Detection of Zika virus RNA in whole blood of imported Zika virus disease cases up to 2 months after symptom onset, Israel, December 2015 to April 2016. *Euro Surveill* 2016;21.

Ma CS, Nichols KE, Tangye SG. Regulation of cellular and humoral immune responses by the SLAM and SAP families of molecules. *Annu. Rev. Immunol.* 2007; 25: 337–79.

Ma W, Li S, Ma S, Jia L, Zhang F, Zhang Y, et al. Zika virus causes testis damage and leads to male infertility in mice. *Cell* 2016;167:1511-24 e10.

Maffucci P, Bigio B, Rappaport F, Cobat A, Borghesi A, Lopez M, et al. Blacklisting variants common in private cohorts but not in public databases optimizes human exome analysis. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2019 Jan 15;116(3):950-959. doi: 10.1073/pnas.1808403116.

Maher B. Personal genomes: The case of the missing heritability. *Nature.* 2008 Nov 6;456(7218):18-21. doi: 10.1038/456018a.

Manolio TA, Collins FS, Cox NJ, Goldstein DB, Hindorff LA, Hunter DJ. et al. Finding the missing heritability of complex diseases. *Nature.* 2009; 461, 747–753. <https://doi.org/10.1038/nature08494>

Mansuy JM, Mengelle C, Pasquier C, Chapuy-Regaud S, Delobel P, Martin-Blondel G, et al. Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. *Emerg Infect Dis* 2017;23:863-5.

Marano G, Pupella S, Vaglio S, Liembruno GM, Grazzini G. Zika virus and the never-ending story of emerging pathogens and Transfusion Medicine. *Blood Transfusion.* 2016;14(2):95-100. doi:10.2450/2015.0066-15.

Marchette NJ, Garcia R, Rudnick A. Isolation of Zika virus from *Aedes aegypti* mosquitoes in Malaysia. *Am J Trop Med Hyg.*1969;18:411–5.

Marie I, Durbin JE, Levy DE. Differential viral induction of distinct interferon-alpha genes by positive feedback through interferon regulatory factor-7. *EMBO J.* 1998;17(22):6660–6669.

Martines RB, Bhatnagar J, Ramos AMO, Davi HP, Iglezias SD, Kanamura CT, et al. Pathology of congenital Zika syndrome in Brazil: a case series. *Lancet.* 2016; 388: 898–904. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30883-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30883-2)

Martins MM, Alves da Cunha AJL, Robaina JR, Raymundo CE, Barbosa AP Medronho RdA. Fetal, neonatal, and infant outcomes associated with maternal Zika virus infection during pregnancy: A systematic review and meta-analysis. *PLoS ONE.* 2021; 16(2): e0246643. doi: 10.1371/journal.pone.0246643

Masmejan S, Musso D, Vouga M, Pmar L, Dashraat P, Stojanov M, et al. Zika virus. *Pathogens.* 2020. 9, 898; doi:10.3390/pathogens9110898

Mead PS, Duggal NK, Hook SA, DeLorey M, Fischer M, McGuire DO, et al. Zika Virus Shedding in Semen of Symptomatic Infected Men. *N. Engl. J. Med.* 2018, 378, 1377–1385.

Meertens L, Carnec X, Lecoin MP, Ramdasi R, Guivel-Benhassine F, Lew E, et al. The TIM and TAM families of phosphatidylserine receptors mediate dengue virus entry. *Cell Host Microbe.* 2012; 12: 544–57. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2012.08.009>.

Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, et al. Axl mediates ZIKA virus entry in human glial cells and modulates innate immune responses. *Cell Rep.* 2017; 18: 324–33. <http://dx.doi.org/10.1016/j.celrep.2016.12.045>.

Mendes AKT, Ribeiro MRC, Lamy-Filho F, Amaral GA, Borges MCR, Costa LC, et al. 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.* 2020;62:e56. doi: 10.1590/s1678-9946202062056.

Meyer K, Feldman HM, Lu T, Drake D, Lim ET, Ling KH, et al. REST and Neural Gene Network Dysregulation in iPSC Models of Alzheimer’s Disease. *Cell Rep.* 2019; 26(5):1112-27. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2019.01.023>

Meynert AM, Ansari M, FitzPatrick DR, Taylor MS. Variant detection sensitivity and biases in whole genome and exome sequencing. *BMC Bioinformatics.* 2014 Jul 19;15(1):247. doi: 10.1186/1471-2105-15-247.

Meyts I, Bosch B, Bolze A, et al. Exome and genome sequencing for inborn errors of immunity. *J Allergy Clin Immunol.* 2016; 138(4). <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaci.2016.08.003>

Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nat Microbiol.* 2017 Nov;2(11):1462-1470. doi: 10.1038/s41564-017-0035-0.

Milne TA, Briggs SD, Brock HW, Martin ME, Gibbs D, Allis CD, et al. MLL targets SET domain methyltransferase activity to Hox gene promoters. *Mol Cell.* 2002; 10:107–1117.

Miner JJ, Diamond MS. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host Microbe* 2017, 21, 134–142.

Miner JJ, Sene A, Richner JM, Smith AM, Santeford A, Ban N, et al. Zika virus infection in mice causes panuveitis with shedding of virus in tears. *Cell Rep* 2016;16:3208-18.

Ming GI, Tang H and Song H. Advances in Zika virus research: stem cell modes, challenges and opportunities. *Cell Stem Cell.* 2016; 19: 690:702.

Mlakar J, Korva M, Tul N, Popovic M, Poljsak-Prijatelj M, Mraz J, et al. Zika virus associated with microcephaly. *N Engl J Med* 2016;374:951-8.

Mohr EL. Modeling Zika virus-associated birth defects in nonhuman primates. *J Pediatric Infect Dis Soc.* 2018; 7, S60–S66. doi: 10.1093/jpids/piy120.

Moi ML, Nguyen TTT, Nguyen CT, et al. Zika virus infection and microcephaly in Vietnam. *Lancet Inf Dis* 2017;17(8):8055-6. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30412-7.

Monel B, Compton AA, Bruel T, Amraoui S, Burlaud-Gaillard J, Roy N, et al. Zika virus induces massive cytoplasmic vacuolization and paraptosis-like death in infected cells. *EMBO J.* 2017, 36, 1653–1668.

Moore DL, Causey OR, Carey DE, Reddy S, Cooke AR, Akinkugbe FM, et al. Arthropod-borne viral infections of man in Nigeria, 1964–1970. *Ann Trop Med Parasitol.* 1975;69:49–64.

Moura da Silva AA, Ganz JS, Sousa PD, Doriqui MJ, Ribeiro MR, Branco MD, et al. Early Growth and Neurologic Outcomes of Infants with Probable Congenital Zika Virus Syndrome. *Emerg Infect Dis.* 2016 Nov;22(11):1953-1956. doi: 10.3201/eid2211.160956.

Mulkey SB, Arroyave-Wessel M, Peyton C, Bulas DI, Fourzali Y, Jiang JJ, et al. Neurodevelopmental Abnormalities in Children With In Utero Zika Virus Exposure Without Congenital Zika Syndrome. *JAMA Pediatr.* 2020; doi:10.1001/jamapediatrics.2019.5204

Muller DA, Young PR: The flavivirus NS1 protein: molecular and structural biology, immunology, role in pathogenesis and application as a diagnostic biomarker. *Antiviral Res.* 2013; 98(2): 192–208.

Murray KO, Gorchakov R, Carlson AR, Berry R, Lai L, Natrajan M, et al. Prolonged detection of Zika virus in vaginal secretions and whole blood. *Emerg Infect Dis* 2017;23:99-101.

Musso D, Gubler DJ. Zika virus. *Clin Microbiol Rev* 2016;29:487-524.

Musso D, Ko AI, Baud D. Zika Virus Infection—After the Pandemic. *N. Engl. J. Med.* 2019, 381, 1444–1457.

Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, et al. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Euro Surveill.* 2014; 10;19(14).

Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau VM. Potential sexual transmission of Zika virus. *Emerg Infect Dis* 2015;21:359-61.

Naslavsky MS, Yamamoto GL, de Almeida TF, Ezquina SAM, Sunaga DY, Pho N, et al. Exomic variants of an elderly cohort of Brazilians in the ABraOM database. *Hum Mutat.* 2017; 38(7):751-763. doi: 10.1002/humu.23220.

Netto, E.M.; Moreira-Soto, A.; Pedroso, C.; Höser, C.; Funk, S.; Kucharski, A.J.; Rockstroh, A.; Kümmerer, B.M.; Sampaio, G.S.; Luz, E.; et al. High Zika virus seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil limits the potential for further outbreaks. *MBio* 2017, 8, e01390-17.

Newport MJ, Huxley CM, Huston S, Hawrylowicz CM, Oostra BA, et al. A mutation in the interferon-gamma-receptor gene and susceptibility to mycobacterial infection. *N. Engl. J. Med.* 1996; 335:1941–1949.

Ng SB, Bigham AW, Buckingham KJ, Hannibal MC, McMillin MJ, Gildersleeve HI et al. Exome sequencing identifies MLL2 mutations as a cause of Kabuki syndrome. *Nat Genet.* 2010;42:790–793.

Notarangelo LD: Primary immunodeficiencies. *J Allergy Clin Immunol* 2010, 125(2 Suppl 2):S182–S194.

O’Roak BJ, Vives L, Girirajan S, et al. Sporadic autism exomes reveal a highly interconnected protein network of de novo mutations. *Nature.* 2012;485:246–250.

Oehler E, Watrin L, Larre P, Leparac-Goffart I, Lastere S, Valour F, et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome—case report, French Polynesia, December 2013. *Euro Surveill* 2014;19:20720.

Ogunjimi B, Zhang SY, Sorensen KB, Skipper KA, Carter-Timofte M, Kerner G, et al. Inborn errors in RNA polymerase III underlie severe varicella zoster virus infections. *J Clin Invest.* 2017; ; 127(9):3543:56.

Ohsumi Y. Historical landmarks of autophagy research. *Cell Res.* 2014 Jan;24(1):9-23. doi: 10.1038/cr.2013.169.

Ojha CR, Rodriguez M, Karuppan MKM, Lapierre J, Kashanchi F, El-Hage N. Toll-like receptor 3 regulates Zika virus infection and associated host inflammatory response in primary human astrocytes. *PLoS One.* 2019;8:4(2):e0208543. doi: 10.1371/journal.pone.0208543 14, e0208543.

Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman, Triwibowo. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 1981;75:389–93. DOI: 10.1016/0035-9203(81)90100-0

Onorati M, Li Z, Liu F, Sousa AMM, Nakagawa N, Li M, et al. Zika virus disrupts phospho-tbkl1 localization and mitosis in human neuroepithelial stem cells and radial glia. *Cell Rep.* 2016, 16, 2576–2592.

Oved JH, Babushok DV, Lambert MP, Wolfset N, Kowalska MA, Poncz M, et al. Human mutational constraint as a tool to understand biology of rare and emerging bone marrow failure syndromes. *Blood Adv.* 2020 Oct 27;4(20):5232-5245. doi: 10.1182/bloodadvances.2020002687.

Pagani I, Ghezzi S, Ulisse A, Rubio A, Turrini F, et al. Human Endometrial Stromal Cells Are Highly Permissive To Productive Infection by Zika Virus. *Sci Rep.* 2017; 7: 44286. <https://doi.org/10.1038/srep44286>

Pan American Health Organization. PLISA Health Information Platform for the Americas: Cases of Zika virus disease, by country or territory. <http://www.paho.org/data/index.php/en/mnu-topics/zika/524-zika-weekly-en.htm> [accessado em 06/07/2021].

Parola P, Musso D. Zika, dengue, chikungunya and yellow fever infections in Europe?—Winter is over, warm days are coming—So hedge your bets. *Travel Med. Infect. Dis.* 2020, 35, 101614.

Peçanha PM, Gomes Junior SC, Pone SM, Pone MVdS, Vasconcelos Z, Zin A, et al. Neurodevelopment of children exposed intra-uterus by Zika virus: A case series. *PLoS ONE.* 2020;15(2): e0229434. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229434>

Peled A, Sarig O, Sun G, et al. Loss-of-function mutations in caspase recruitment domain-containing protein 14 are associated with a severe variant of atopic dermatitis. *J Allergy Clin Immunol.* 2019;143:173–81

Perera-Lecoin M, Meertens L, Carnec X, and Amara, A. Flavivirus entry receptors: an update. *Viruses.* 2013; 6: 69–88.

Persaud M, Martinez-Lopez A, Buffone C, Porcelli SA, Diaz-Griffero F. Infection by Zika viruses requires the transmembrane protein AXL, endocytosis and low pH. *Virology.* 2018; 518:301-12. <https://doi.org/10.1016/j.virol.2018.03.009>.

Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA. Zika virus. *N Engl J Med* 2016;374:1552-63.

Petry CJ, Mooslehner K, Prentice P, et al. Associations between a fetal imprinted gene allele score and late pregnancy maternal glucose concentrations. *Diabetes Metab.* 2017 Sep;43(4):323-331. doi: 10.1016/j.diabet.2017.03.002.

Petry CJ, Seear RV, Wingate DL, et al. Associations between paternally transmitted fetal IGF2 variants and maternal circulating glucose concentrations in pregnancy. *Diabetes.* 2011 Nov;60(11):3090-6. doi: 10.2337/db11-0689.

Platanias LC. Mechanisms of type-I- and type-II-interferon-mediated signalling. *Nat Rev Immunol* 2005;5:375-86.

Plociennikowska A, Frankish J, Moraes T, Del Prete D, Kahnt F, Acuna C et al. TLR3 activation by Zika virus stimulates inflammatory cytokine production which dampens the antiviral response induced by RIG-I-like receptors. *J Virol.* 2021 Mar 3;95(10):e01050-20. doi: 10.1128/JVI.01050-20.

Pomar L, Vouga M, Lambert V, Pomar C, Hcini N, Jolivet A, et al. Maternal-fetal transmission and adverse perinatal outcomes in pregnant women infected with Zika virus: Prospective cohort study in French Guiana. *BMJ* 2018, 363, k4431.

Procopio B, Manti S, Bianco G, Conti G, Romeo A, Maimone F, et al. Genotype-phenotype correlation in FMF patients: a “non classic” recessive autosomal or “atypical” autosomal dominant inheritance? *Gene.* 2018;641:279-86

Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O’Neal JT, et al. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell Host Microbe* 2016,20, 83–90.

Qureshi S, Sheikh MDA, Qamar FN. Autosomal recessive agammaglobulinemia - first case with a novel TCF3 mutation from Pakistan. *Clin Immunol.* 2019;198:100–1. <https://doi.org/10.1016/j.clim.2018.07.016>.

Razavi P, Chang MT, Xu G, Bandlamudi C, Ross DS, Vasan N, et al. The Genomic Landscape of Endocrine-Resistant Advanced Breast Cancers. *Cancer cell*. 2018; 34(3), 427–438.e6. <https://doi.org/10.1016/j.ccell.2018.08.008>

Retallack H, Di Lullo E, Arias C, Knopp KA, Laurie MT, Sandoval-Espinosa C, et al. Zika virus cell tropism in the developing human brain and inhibition by azithromycin. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 2016, 113, 14408–14413.

Rieder CA, Rieder J, Sannajust S, Goode D, Geguchadze R, Relich RF, et al. A Novel Mechanism for Zika Virus Host-Cell Binding. *Viruses*. 2019; 11, 1101. doi:10.3390/v11121101

Riedl W, Acharya D, Lee JH, Liu G, Serman T, Chiang C, et al. Zika Virus NS3 Mimics a Cellular 14-3-3-Binding Motif to Antagonize RIG-I- and MDA5-Mediated Innate Immunity. *Cell Host & Microbe*. 2019;26, 493–503. <https://doi.org/10.1016/j.chom.2019.09.012>

Robbins JR, Skrzypczynska KM, Zeldovich VB, Kapidzic M, Bakardjiev AI. Placental syncytiotrophoblast constitutes a major barrier to vertical transmission of *Listeria monocytogenes*. *PLoS Pathog* 2010;6:e1000732.b

Rossi AD, Faucz FR, Melo A, Pezzuto P, de Azevedo GS, Schamber-Reis BLF, et al. Variations in maternal adenylate cyclase genes are associated with congenital Zika syndrome in a cohort from Northeast, Brazil. *J Intern Med*. 2019 Feb;285(2):215-222. doi: 10.1111/joim.12829.

Rossi SL, Tesh RB, Azar SR, Muruato AE, Hanley KA, Auguste AJ, et al. Characterization of a novel murine model to study Zika virus. *Am J Trop Med Hyg* 2016;94:1362-9.

Routhu NK and Byrareddy SN. Host-Virus Interaction of ZIKA Virus in Modulating Disease Pathogenesis. *J Neuroimm Pharmacol*. 2017; 12(2): 219–32.

Roze B, Najioullah F, Ferge JL, Apetse K, Brouste Y, Cesaire R, et al. Zika virus detection in urine from patients with Guillain-Barre syndrome on Martinique, January 2016. *Euro Surveill* 2016;21:30154.

Samuel MA, Diamond MS. Alpha/beta interferon protects against lethal West Nile virus infection by restricting cellular tropism and enhancing neuronal survival. *J Virol* 2005;79:13350-61.

Sanchez Clemente N, Brickley EB, Paixão ES, De Almeida MF, Gazeta RE, Vedovello D, et al. Zika virus infection in pregnancy and adverse fetal outcomes in São Paulo State, Brazil: a prospective cohort study. *Sci Rep*. 2020 Jul 29;10(1):12673. doi: 10.1038/s41598-020-69235-0.

Sanchez Clemente N, Rodrigues M, Pascalicchio AP, et al. Cohort profile: the Jundiá Zika cohort (JZC), a pregnancy and birth cohort in São Paulo state, Brazil. *BMJ Open* 2019;9:e027947. doi:10.1136/bmjopen-2018-027947

Sancho-Shimizu V, Pérez de Diego R, Lorenzo L, Halwani R, Alangari A, Israelsson E, et al. Herpes simplex encephalitis in children with autosomal recessive and dominant TRIF deficiency. *J Clin Invest*. 2011 Dec;121(12):4889-902.

Santos CNO, Ribeiro DR, Cardoso Alves J, Cazzaniga RA, Magalhães LS, et al. Association Between Zika Virus Microcephaly in Newborns With the rs3775291 Variant in Toll-Like Receptor 3 and rs1799964 Variant at Tumor Necrosis Factor-alpha Gene. *J Infect Dis*. 2019 Oct 22;220(11):1797-1801. doi: 10.1093/infdis/jiz392.

Santos VS, Oliveira SJG, Gurgel RQ, Lima DRR, Dos Santos CA,; Martins-Filho PRS. Case report: Microcephaly in twins due to the Zika Virus. *Am. J. Trop. Med. Hyg*. 2017, 97, 151–154.

Sasseti M, Zé-Zé L, Franco J, et al. First case of confirmed congenital Zika syndrome in continental Africa. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 2018;112(10):458-462. doi: 10.1093/trstmh/try074.

Saura CA, Choi SY, Beglopoulos V, Malkani S, Zhang D, Shankaranarayana Rao BS, et al. Loss of presenilin function causes impairments of memory and synaptic plasticity followed by age-dependent neurodegeneration. *Neuron*. 2004 Apr 8;42(1):23-36. doi: 10.1016/s0896-6273(04)00182-5.

Savidis G, Perreira JM, Portmann JM, Meraner P, Guo Z, Green S, Brass AL. The ifitms inhibit zika virus replication. *Cell Rep*. 2016, 15, 2323–2330.

Sayos J, Wu C, Morra M, et al. The X-linked lymphoproliferative-disease gene product SAP regulates signals induced through the co-receptor SLAM. *Nature*. 1998;395:462-469.

Schilling M, Bridgerman A, Gray N, Hertzog J, Hublitz P, Kohl A, et al. RIG-I Plays a Dominant Role in the Induction of Transcriptional Changes in Zika Virus-Infected Cells, which Protect from Virus-Induced Cell Death. *Cells*. 2020; 9,1476; doi:10.3390/cells9061476

Schlee M. Master sensors of pathogenic RNA - RIG-I like receptors. *Immunobiology*. 2013; 218:1322-1335. doi: 10.1016/j.imbio.2013.06.007

Schwartz DA. 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*. 2017a; 141(1):68-72.

Schwartz DA. Viral infection, proliferation, and hyperplasia of Hofbauer cells and absence of inflammation characterize the placental pathology of fetuses with congenital Zika virus infection. *Arch. Gynecol. Obstet*. 2017b, 295, 1361–1368.

Scudiero I, Zotti T, Ferravante A, et al. Alternative splicing of CARMA2/CARD14 transcripts generates protein variants with differential effect on NF- $\kappa$ B activation and endoplasmic reticulum stress-induced cell death. *J. Cell. Physiol.*, 226 (2011), pp. 3121-3131

Shabrish S, Kelkar M, Yadav RM, et al. The Spectrum of Clinical, Immunological, and Molecular Findings in Familial Hemophagocytic Lymphohistiocytosis: Experience From India. *Front Immunol.* 2021; 05 March 2021 | <https://doi.org/10.3389/fimmu.2021.612583>

Simmons HA. Age-associated pathology in rhesus macaques (*Macaca mulatta*). *Vet. Pathol.* 2016; 53, 399–416. doi: 10.1177/0300985815620628.

Simoni MK, Jurado KA, Abrahams VM, Fikrig E, Guller S. Zika virus infection of Hofbauer cells. *Am.J. Reprod. Immunol.* 2016, 77, e12613.

Sjöstedt E, Zhong W, Fagerberg L, et al. An atlas of the protein-coding genes in the human, pig, and mouse brain. *Science.* 2020. Doi: 10.1126/science.aay5947

Soares de Oliveira-Szejnfeld P, Levine D, Melo AS, Amorim MM, Batista AG, Chimelli L, et al. Congenital brain abnormalities and Zika virus: What the radiologist can expect to see prenatally and postnatally. *Radiology.* 2016; 281: 203–218.

Sobhani NC, Avvad-Portari E, Nascimento ACM, Machado HN, Lobato DSS, Pereira JP, et al. Discordant Zika virus findings in twin pregnancies complicated by antenatal Zika Virus exposure: A prospective cohort. *J. Infect. Dis.* 2020, 221, 1838–1845.

Song W, Nadeau P, Yuan M, Yang X, Shen J, Yankner BA. Proteolytic release and nuclear translocation of Notch-1 are induced by presenilin-1 and impaired by pathogenic presenilin-1 mutations. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96:6959–63.

Speicher MR, Motulsky AG, Antonarakis SE. *Vogel and Motulsky's Human Genetics – problems and approachers.* 4th edition. Heidelberg: Springer 2010.

Spessott WA, Sanmillan ML, McCormick ME, Patel N, Villanueva J, Zhang K, et al. Hemophagocytic lymphohistiocytosis caused by dominant-negative mutations in STXBP2 that inhibit SNARE-mediated membrane fusion. *Blood* (2015) 125 (10): 1566–1577. <https://doi.org/10.1182/blood-2014-11-610816>

Spiegel I, Salomon D, Erne B, et al. Caspr3 and caspr4, two novel members of the caspr family are expressed in the nervous system and interact with PDZ domains. *Mol Cell Neurosci.* 2002;20:283–297

Stellacci E, Onesimo R, Bruselles A, Pizzi S, Battaglia D, Leoni C, et al. Congenital immunodeficiency in an individual with Wiedemann-Steiner syndrome due to a novel missense mutation in KMT2A. *Am. J. Med. Genet. A.* 2016; 170, 2389–2393.

Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, et al.: Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science.* 2016; 353(6301): 823–6.

Stuart BD, Choi J, Zaidi S, Xing C, Holohan B, Chen R, et al. Exome sequencing links mutations in PARN and RTEL1 with familial pulmonary fibrosis and telomere shortening. *Nature Genet.* 2015; 47:512-517.

Sun Y, Hu G, Liu H, Zhang X, Huang Z, Yan H, et al. Further delineation of the phenotype of truncating KMT2A mutations: The extended Wiedemann-Steiner syndrome. *Am J Med Genet A.* 2017. Feb;173(2):510-514.

Swaminathan S, Schlager R, Lewis J, Hanson KE, Couturier MR. Fatal Zika virus infection with secondary nonsexual transmission. *N Engl J Med* 2016;375:1907-9.

Takeuchi O, Akira S. Pattern recognition receptors and inflammation. *Cell.* 2010; 140:805-820. doi: 10.1016/j.cell.2010.01.022

Tan JLL, Balne PK, Leo YS, Tong L, Ng LFP, Agrawal R. Persistence of Zika virus in conjunctival fluid of convalescence patients. *Sci Rep* 2017;7:11194.

Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, Cunningham-Rundles C, Franco JL, Holland SM. The Ever-Increasing Array of Novel Inborn Errors of Immunity: An Interim Update by the IUIS Committee. *Journal Clin Immunol.* 2021; <https://doi.org/10.1007/s10875-021-00980-1>

Tangye SG, Al-Herz W, Bousfiha A, et al. Human Inborn Errors of Immunity: 2019 Update on the Classification from the International Union of Immunological Societies Expert Committee. *J Clin Immunol.* 2020 Jan;40(1):65. doi.org/10.1007/s10875-019-00737-x

Thomsen MM, Jorgensen SF, Gad HH, et al. Defective interferon priming and impaired antiviral responses in a patient with an IRF7 variant and severe influenza. *Medical Microbiology and Immunology.* 2019; 208:869–876.

Tong DL, Chen RG, Lu YL, et al. The critical role of ASD-related gene CNTNAP3 in regulating synaptic development and social behavior in mice. *Neurobiol Dis.* 2019 Oct;130:104486. doi: 10.1016/j.nbd.2019.104486. Epub 2019 May 29.

Touitou I, Lesage S, Mcdermott M, et al. Infervers: na evolving mutation database for auto-inflammatory syndromes. *Hum Mutat sept* 2004;24(3):194-8.

Traut W, Weichenhan D, Himmelbauer H, Winking H. New members of the neurexin superfamily: multiple rodent homologues of the human CASPR5 gene. *Mamm Genome*. 2006;17:723–731.

Tripathi S, Balasubramaniam VR, Brown JA, Mena I, Grant A, Bardina SV et al. A novel Zika virus mouse model reveals strain specific differences in virus pathogenesis and host inflammatory immune responses. *PLoS Pathog* 2017; 13:e1006258.

Trizzino A, zur Stadt U, Ueda I, et al. Genotype-phenotype study of familial haemophagocytic lymphohistiocytosis due to perforin mutations. *J Med Genet*. (2008) 45:15–21.

Van der Linden V, Filho ELR, Lins OG, van der Linden A, Aragão MFVV, Brainer-Lima AM, et al. Congenital Zika syndrome with arthrogryposis: retrospective case series study. *BMJ*.2016; 354:i3899. <https://doi.org/10.1136/bmj.i3899>

van der Linden V, van der Linden H Jr, de Carvalho Leal M, Filho ELR, van der Linden A, Aragão MdFVV et al. Discordant clinical outcomes of congenital Zika virus infection in twin pregnancies. *Arq. Neuro-Psiquiatr*.2017, 75, 381–386.

Vanella KM, Stein S, Connely M, Swerczek J, Amaro-Carambot E, Coyle EM, et al. Nonhuman primates exposed to Zika virus in utero are not protected against reinfection at 1 year postpartum. *Sci Transl Med*. 2021; 12, eaaz4997. Doi: 10.1126/scitranslmed.aaz4997

Vianna RAO, Lovero KL, Oliveira AS, Fernandes AR, dos Santos TCS, Lima CSS, et al. Children Born to Mothers with Rash During Zika Virus Epidemic in Brazil: First 18 Months of Life. *Journal of Tropical Pediatrics*, 2019, 0, 1–11. doi: 10.1093/tropej/fmz019

Vicenti I, Boccuto A, Giannini A, Dragoni F, Saladini F, Zazzi M. Comparative analysis of different cell systems for Zika virus (ZIKV) propagation and evaluation of anti-ZIKV compounds in vitro. *Virus Res*. 2018; Jan 15;244:64-70. doi: 10.1016/j.virusres.2017.11.003.

Visscher PM, Hill WG, Wray NR. Heritability in the genomics era--concepts and misconceptions. *Nat Rev Genet*. 2008;9(4):255-66. doi: 10.1038/nrg2322

Walne, AJ, Vulliamy T, Kirwan M, Plagnol V, Dokal I. Constitutional mutations in RTEL1 cause severe dyskeratosis congenita. *Am. J. Hum. Genet*. 92: 448-453, 2013.doi.org/10.1016/j.ajhg.2013.02.001

Walter, J.E.; Rosen, L.B.; Csomos, K., et al. Broad-spectrum antibodies against self-antigens and cytokines in RAG deficiency. *J. Clin. Investig*. 2015, 125, 4135–4148.

Wang J, Chun HJ, Wong W, Spencer DM, Lenardo MJ. Caspase-10 is an initiator caspase in death receptor signaling. *Proc. Nat. Acad. Sci*. 2001; 98:13884-13888.

Wang J, Zheng L, Lobito A, Chan FK, Dale J, Sneller M, et al. Inherited human caspase 10 mutations underlie defective lymphocyte and dendritic cell apoptosis in autoimmune lymphoproliferative syndrome type II. *Cell*. 1999; 98: 47-58.

Wang YT, Branche E, Viramontes KM, Cuevas JV, Carlin AF, Shresta S. Zika virus suppresses maturation of human dendritic cells. *J Immunol*. 2020; 204 (1 Supplement) 248.11.

Weichenhan D, Traut W, Gongrich C, et al. A mouse translocation associated with Caspr5-2 disruption and perinatal lethality. *Mamm Genome*. 2008;19:675–686.

Wells MF, Salick MR, Wiskow O, Ho DJ, Worringer KA, Ihry RJ, et al. Genetic ablation of AXL does not protect human neural progenitor cells and cerebral organoids from Zika virus infection. *Cell Stem Cell*. 2016; 19: 703–708. <http://dx.doi.org/10.1016/j.stem.2016.11.011>.

WHO. WHO Director-General Summarizes the Outcome of the Emergency Committee Regarding Clusters of Microcephaly and Guillain-Barré Syndrome. Available online: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/emergency-committee-zika-microcephaly/en/> [acessado em 8 de abril de 2018].

WHO. Zika virus disease 2020. Dispon[ível em [https://www.who.int/healthtopics/zika-virus-disease#tab=tab\\_1](https://www.who.int/healthtopics/zika-virus-disease#tab=tab_1) [acessado em 07 de julho de 2021].

Wies E, Wang MK, Maharaj NP, Chen K, Zhou S, Finberg RW, et al. Dephosphorylation of the RNA sensors RIG-I and MDA5 by the phosphatase PP1 is essential for innate immune signaling. *Immunity*. 2013 Mar 21;38(3):437-49. doi: 10.1016/j.immuni.2012.11.018.

Winkler CW, Myers LM, Woods TA, Messer RJ, Carmody AB, McNally KL et al. Adaptive immune responses to Zika virus are important for controlling virus infection and preventing infection in brain and testes. *J Immunol* 2017; 198:3526–35.

Wongsurawat T, Athipanyasilp N, Jenjaroenpun P, et al. Case of microcephaly after congenital infection with Asian lineage Zika virus, Thailand. *Emerg Infect Dis* 2018;24(9):1758-61. doi: 10.3201/eid2409.180416.

Wu MC, Lee S, Cai T, Boehnke M, Lin X. Rare-Variant Association Testing for Sequencing Data with the Sequence Kernel Association Test. *Am J Hum Genet*. 2011; 89(1):82-93. 10.1016/j.ajhg.2011.05.029

Wu Y, Liu Q, Zhou J, Xie W, Chen C, Wang Z, et al Zika virus evades interferon-mediated antiviral response through the co-operation of multiple nonstructural proteins in vitro. *Cell Discov*. 2017Mar 21;3:17006. doi: 10.1038/celldisc.2017.6.

Xu H, Yang J, Gao W, Li L, Li P, Zhang L, et al. Innate immune sensing of bacterial modifications of Rho GTPases by the Pyrin inflammasome. *Nature*. 2014; 513:237–41. doi: 10.1038/nature13449

Xu X, Yang Y, Liu X, Cao N, Zhang P, Zhao S, et al. NFE2L2/KEAP1 Mutations Correlate with Higher Tumor Mutational Burden Value/PD-L1 Expression and Potentiate Improved Clinical Outcome with Immunotherapy. *Oncologist*. 2020 Jun;25(6):e955-e963. doi: 10.1634/theoncologist.2019-0885.

Yang L, Fan X, Cui T, Dang E, Wang G. Nrf2 Promotes Keratinocyte Proliferation in Psoriasis through Up-Regulation of Keratin 6, Keratin 16, and Keratin 17. *J Invest Dermatol*. 2017 Oct;137(10):2168-2176. doi: 10.1016/j.jid.2017.05.015

Yang W, Lee PP, Thong MK, Ramanujam TM, Shanmugam A, Koh MT, et al. Compound heterozygous mutations in TTC7A cause familial multiple intestinal atresias and severe combined immunodeficiency. *Clin Genet*. 2015;88(6):542-9.

Zanluca, C., de Melo, V. C., Mosimann, A. L., Dos Santos, G. I., Dos Santos, C. N. & Luz, K. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Mem Inst Oswaldo Cruz*, 2015; 110, 569–572.

Zhang F, Hammack C, Ogden SC, Cheng Y, Lee EM, Wen Z, et al. Molecular signatures associated with ZIKV exposure in human cortical neural progenitors. *Nucleic Acids Res*. 2016; 44:8610–8620.

Zhang Q, Bastard P, Bolze A, Jouanguy E, Zhang SY; COVID Human Genetic Effort, Cobat A, Notarangelo LD, Su HC, Abel L, Casanova JL. Life-Threatening COVID-19: Defective Interferons Unleash Excessive Inflammation. *Med (N Y)*. 2020b Dec 18;1(1):14-20. doi: 10.1016/j.medj.2020.12.001.

Zhang Q, Bastard P, Liu Z, Le Pen J, Moncada-Velez M, Chen J, et al. Inborn errors of type I IFN immunity in patients with life-threatening COVID-19. *Science*. 2020a Oct 23;370(6515):eabd4570. doi: 10.1126/science.abd4570

Zhang S, Cai F, Wu Y, Bozorgmehr T, Wang Z, Zhang S, et al. A presenilin-1 mutation causes Alzheimer disease without affecting Notch signaling. *Mol Psychiatry*. 2018 Mar;25(3):603-613. doi: 10.1038/s41380-018-0101-x.

Zhang SY, Clark NE, Freije CA, Pauwels E, Taggart AJ, Okada S, et al. Inborn errors of RNA Lariat metabolism in humans with brainstem viral infection. *Cell*. 2018, 172:952-965.

Zhang W, Ng HW, Shu M, Luo H, Su ZQ, Ge W, et al. Comparing genetic variants detected in the 1000 genomes project with SNPs determined by the International HapMap Consortium *J Genet*. 2015. Dec;94(4):731-40. doi: 10.1007/s12041-015-0588-8.

Zhang Z, Nadeau P, Song W, Donoviel D, Yuan M, Bernstein A, et al. Presenilins are required for gamma-secretase cleavage of beta-APP and transmembrane cleavage of Notch-1. *Nat Cell Biol*. 2000;2:463–5.

Zheng Y, Liu Q, Wu Y, Ma L, Zhang Z, Liu T, et al. Zika virus elicits inflammation to evade antiviral response by cleaving cGAS via NS1- caspase-1 axis. *EMBO J*. 2018; 37 (18). <https://doi.org/10.15252/embj.201899347>.

Zin AA, Tsui I, Rossetto J, et al. Screening criteria for ophthalmic manifestations of congenital zika virus infection. *JAMA Pediatr* 2017;171:847–54.



## ANEXO A – Termos de Consentimento Livre e Esclarecido

Universidade de São Paulo  
Instituto de Ciências Biomédicas

### TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

#### ESTUDO: Bases genéticas imunológicas da susceptibilidade à infecção pelo Zika vírus em humanos

Você está sendo convidado (a) a participar do projeto de pesquisa acima citado. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Sua colaboração neste estudo será de muita importância para nós, mas se desistir a qualquer momento, isso não causará nenhum prejuízo a você.

Eu, \_\_\_\_\_ (inserir nome e profissão), residente e domiciliado em \_\_\_\_\_, portador da Cédula de identidade, RG \_\_\_\_\_, e inscrito no CPF \_\_\_\_\_ nascido(a) em \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade em participar como voluntário(a) do estudo "Bases genéticas imunológicas da susceptibilidade à infecção pelo Zika vírus em humanos". Declaro que obtive todas as informações necessárias, bem como todos os eventuais esclarecimentos quanto às dúvidas por mim apresentadas.

Estou ciente que:

- I) O estudo é necessário para descobrir possíveis mecanismos de aumento de risco à infecção pelo Zika vírus.
- II) Será feita uma coleta de saliva ou sangue da veia (1 a 3 mL);
- III) A participação neste projeto não tem objetivo de me submeter a um tratamento, bem como não me acarretará qualquer despesa financeira com relação aos procedimentos médico-clínico-terapêuticos efetuados no estudo;
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou de interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de qualquer explicação;
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo à minha saúde ou bem estar físico. Não virá interferir no atendimento ou tratamento médico;
- VI) Os resultados obtidos durante este ensaio serão mantidos em sigilo, mas concordo que sejam divulgados em publicações científicas, desde que meus dados pessoais não sejam mencionados;
- VII) Caso eu desejar, poderei pessoalmente tomar conhecimento dos resultados, ao final desta pesquisa.  
( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.  
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo para mim.  
( ) Sim ou ( ) Não
- IX) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICB/USP -, no Fone 3091.7733 (e-mail: cep@icb.usp.br) ou o Prof. Dr. Antonio Condino Neto no Fone 3091.7435 (e-mail: condino@usp.br) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE - apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE- apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_\_\_.

( ) Paciente / ( ) Responsável .....

Testemunha 1: \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2: \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: \_\_\_\_\_  
Prof. Dr. Antonio Condino Neto



**TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO**  
(menores de 18 anos)

**ESTUDO: Bases genéticas imunológicas da susceptibilidade à infecção pelo Zika vírus em humanos**

Seu(ua) filho(a) está sendo convidado(a) a participar do presente estudo. O documento abaixo contém todas as informações necessárias sobre a pesquisa que estamos fazendo. Leia atentamente. Caso tenha dúvidas, teremos prazer em esclarecê-las. Se concordar, o documento será assinado e só então daremos início ao estudo. Sua colaboração será muito importante para nós. Mas, se quiser desistir a qualquer momento, isto não causará nenhum prejuízo, nem a você, nem ao(a) seu(sua) filho(a).

Eu \_\_\_\_\_ RG \_\_\_\_\_, abaixo assinado(a), concordo de livre e espontânea vontade que meu (minha) filho (a) \_\_\_\_\_ nascido (a) em \_\_\_\_ / \_\_\_\_ / \_\_\_\_\_, seja voluntário do estudo "**Bases genéticas imunológicas da susceptibilidade à infecção pelo Zika vírus em humanos**". Declaro que obtive todas as informações necessárias e que todas as minhas dúvidas foram esclarecidas.

Estou ciente de que:

- I) O estudo é necessário para descobrir possíveis mecanismos de aumento no risco à infecção pelo Zika vírus.
- II) Em uma primeira etapa, será feita uma coleta de saliva ou de sangue da veia (de 1 a 3 ml) do(a) meu(minha) filho(a). Caso necessário, em uma segunda etapa (por volta de 2 anos após a primeira), será realizada uma segunda coleta de sangue da veia (até 10 mL) do(a) meu(minha) filho(a).
- III) A participação neste estudo não tem fins terapêuticos e será sem custo algum para mim.
- IV) Tenho a liberdade de desistir ou interromper a colaboração neste estudo no momento em que desejar, sem necessidade de dar qualquer explicação.
- V) A desistência não causará nenhum prejuízo a mim, nem (a) meu (minha) filho (a), nem interferirá no atendimento ou tratamento médico a que ele (ela) estiver sendo submetido.
- VI) Os resultados obtidos durante este estudo serão mantidos em sigilo, mas concordo em que sejam divulgados em publicações científicas, desde que nem o meu nome, nem o de meu filho sejam mencionados.
- VII) Caso eu deseje, poderei tomar conhecimento dos resultados ao final deste estudo.  
( ) Desejo conhecer os resultados desta pesquisa.  
( ) Não desejo conhecer os resultados desta pesquisa.
- VIII) Poderei contatar a Secretaria da Comissão de Ética em Pesquisa com Seres Humanos – ICD/USP - no Fone 3091.7733 (e-mail: cep@ich.usp.br) ou o Prof. Dr. Antonio Condino Neto no Fone 3091.7435 (e-mail: condino@usp.br) para recursos ou reclamações em relação ao presente estudo.
- IX) Concordo que o material possa ser utilizado em outros projetos desde que autorizado pela Comissão de Ética deste Instituto e pelo responsável por esta pesquisa. Caso minha manifestação seja positiva, poderei retirar essa autorização a qualquer momento sem qualquer prejuízo a mim ou ao meu (minha) filho (a). ( ) Sim ou ( ) Não
- X) O sujeito de pesquisa ou seu representante, quando for o caso, deverá rubricar todas as folhas do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XI) O pesquisador responsável deverá da mesma forma, rubricar todas as folhas do TCLE apondo sua assinatura na última página do referido Termo.
- XII) Resolução 196/96 - Estou recebendo uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido;

São Paulo, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 20\_\_

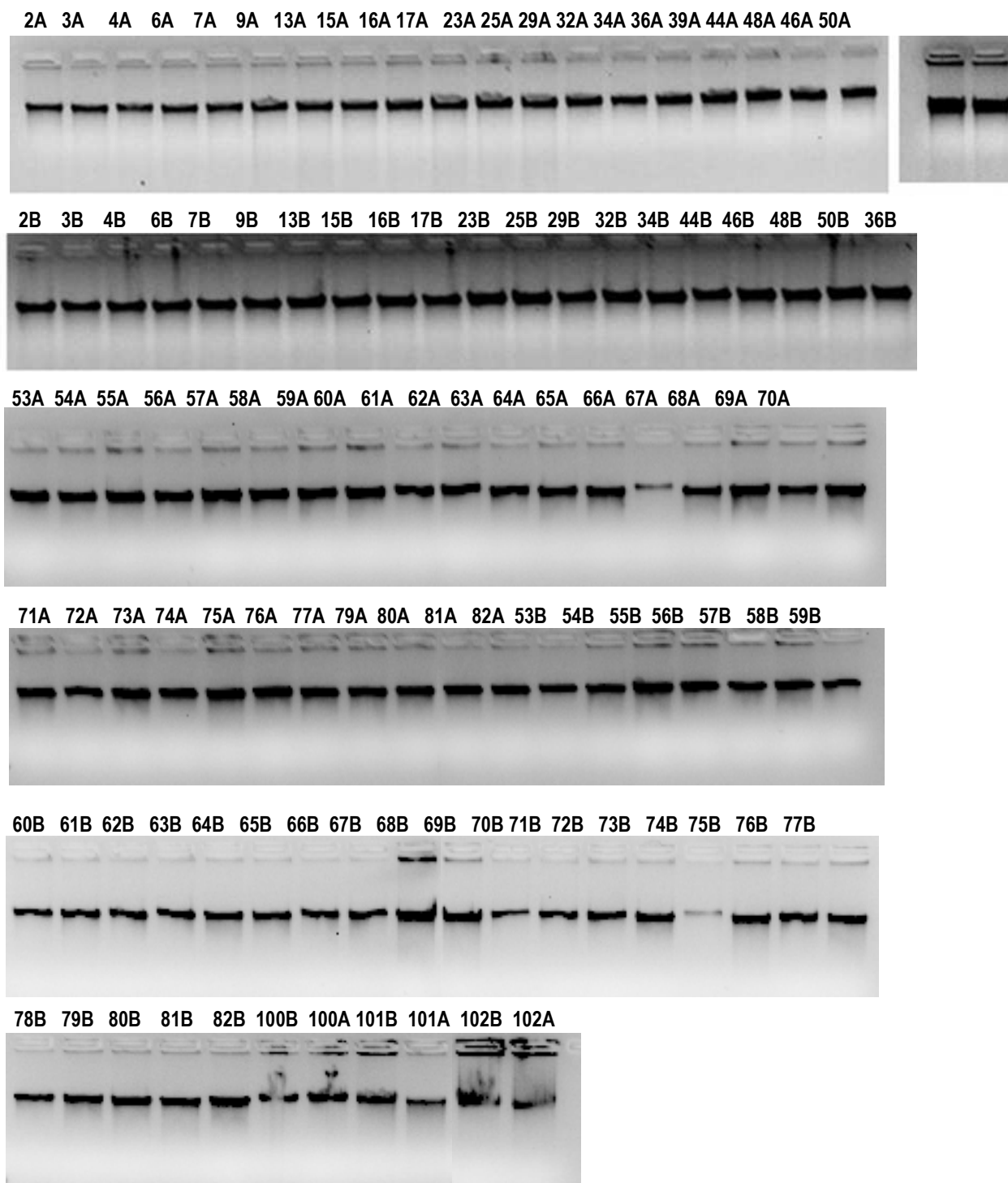
( ) Responsável

Testemunha 1 : \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Testemunha 2 : \_\_\_\_\_  
Nome / RG / Telefone

Responsável pelo Projeto: \_\_\_\_\_  
**Prof. Dr. Antonio Condino Neto**

## ANEXO B – aferição de qualidade das amostras de gDNA



**Figura B. Integridade das amostras de DNA.** DNA genômico corrido em gel TAE com 1,5% agarose, 90V por 40 minutos. As bandas únicas sem arraste indicam que o material genético não possui degradação importante.

A concentração do DNA foi aferida pelo fluorímetro Qbit e a pureza pelo espectrofotômetro Nanodrop 2000. Considerou-se um valor de corte de [DNA] > 17 ng/μL como adequada para envio da amostra para o sequenciamento completo de exoma e a fração 260/280 (que representa a relação de DNA para contaminantes proteicos na amostra)  $\geq 1,7$  (Tabela 4).

**Tabela B. Concentração e pureza das amostras de DNA.**

ID	Grupo	[DNA] ng/μL	Pureza (260/280)	Sequenciamento
053A	ES	38,20	1,95	sim
053B	ES	15,60	1,95	não - DNA insuficiente
054A	ES	62,20	1,94	sim
054B	ES	26,00	1,91	sim
055A	ES	62,00	1,92	sim
055B	ES	17,60	1,94	sim
056A	ES	24,20	1,94	sim
056B	ES	38,80	1,93	sim
057A	ES	26,80	1,93	sim
057B	ES	16,60	2,00	não - DNA insuficiente
058A	ES	18,20	1,99	sim
058B	ES	24,60	1,94	sim
059A	ES	17,00	1,88	não - DNA insuficiente
059B	ES	11,70	1,98	não - DNA insuficiente
060A	ES	69,40	1,95	sim
060B	ES	18,00	1,99	sim
061A	NE	31	1,92	não - grupo NE
061B	NE	185	1,91	não - grupo NE
062A	ES	21,80	1,94	sim
062B	ES	11,50	1,95	não - DNA insuficiente
063A	ES	17,40	2,00	sim
063B	ES	14,90	1,88	não - DNA insuficiente
064A	NE	23,4	1,97	não - grupo NE
064B	NE	165	1,89	não - grupo NE
065A	ES	25,80	2,00	sim
065B	ES	11,40	1,99	não - DNA insuficiente
066A	ES	25,40	1,94	não - integridade (vide Figura 5)
066B	ES	13,50	1,89	não - DNA insuficiente
067A	ES	24,40	1,93	sim
067B	ES	15,80	1,92	não - DNA insuficiente
068A	ES	37,20	1,97	sim
068B	ES	26,80	1,97	sim
069A	NE	50	1,94	não - grupo NE
069B	NE	62,3	1,95	não - grupo NE
070A	ES	24,00	1,96	sim

070B	ES	20,40	1,92	sim
071A	NE	90	1,92	não - grupo NE
071B	NE	12,8	1,94	não - grupo NE
072A	ES	10,00	1,92	não - DNA insuficiente
072B	ES	13,60	1,95	não - DNA insuficiente
073A	ES	24,40	1,93	sim
073B	ES	23,80	2,00	sim
074A	ES	12,20	1,92	não - DNA insuficiente
074B	ES	25,40	1,96	não - integridade (vide Figura 5)
075A	ES	13,40	1,93	não - DNA insuficiente
075B	ES	28,20	1,96	sim
076A	ES	41,80	1,97	sim
076B	ES	17,30	1,98	sim
077A	ES	18,40	1,92	sim
077B	ES	20,00	1,93	sim
079A	NE	35	1,89	não - grupo NE
079B	NE	21,8	2,00	não - grupo NE
080A	ES	35,40	1,96	sim
080B	ES	30,80	1,84	sim
081A	NE	32	1,92	não - grupo NE
081B	NE	40	1,95	não - grupo NE
082A	ES	23,60	1,96	sim
082B	ES	16,70	2,02	não - DNA insuficiente
100A	ES	492,00	1,85	sim
100B	ES	518,00	1,85	sim
101A	ES	81,60	1,87	sim
101B	ES	280,00	1,85	sim
002A	EA	20	1,79	sim
003A	EA	20	1,77	sim
004A	EA	18,5	1,77	sim
006A	EA	21	1,74	sim
007A	EA	21	1,80	sim
009A	EA	41	1,78	sim
013A	EA	40	1,83	sim
015A	EA	27	1,95	sim
016A	EA	30	1,94	sim
017A	EA	64	1,91	sim
023A	EA	60	1,81	sim
025A	EA	51	1,85	sim
029A	EA	28	2,40	sim
032A	EA	18	1,93	sim
034A	EA	22	1,36	sim
036A	EA	45	1,80	sim
039A	EA	34	1,83	sim
044A	EA	37	1,75	sim
046A	EA	40	1,78	sim
048A	EA	23	1,73	sim

050A	EA	30	1,93	sim
002B	EA	33	1,81	sim
003B	EA	20	1,76	sim
004B	EA	20	1,85	sim
006B	EA	22	1,79	sim
007B	EA	22	1,82	sim
009B	EA	20	1,76	sim
013B	EA	25	1,98	sim
015B	EA	28	1,94	sim
016B	EA	32	1,95	sim
017B	EA	18	2,00	sim
023B	EA	34	1,73	sim
025B	EA	37	1,74	sim
029B	EA	18	1,69	sim
032B	EA	20	1,70	sim
034B	EA	37	1,83	sim
036B	EA	23	1,83	sim
044B	EA	18	1,78	sim
046B	EA	18	1,45	sim
048B	EA	20	1,82	sim
050B	EA	20	1,99	sim
102A	EA	153	1,87	não - coletado após sequenciamento do grupo
102B	EA	178	1,88	não - coletado após sequenciamento do grupo

Obs.: EA – exposto afetado, ES – exposto saudável, NE – não exposto.

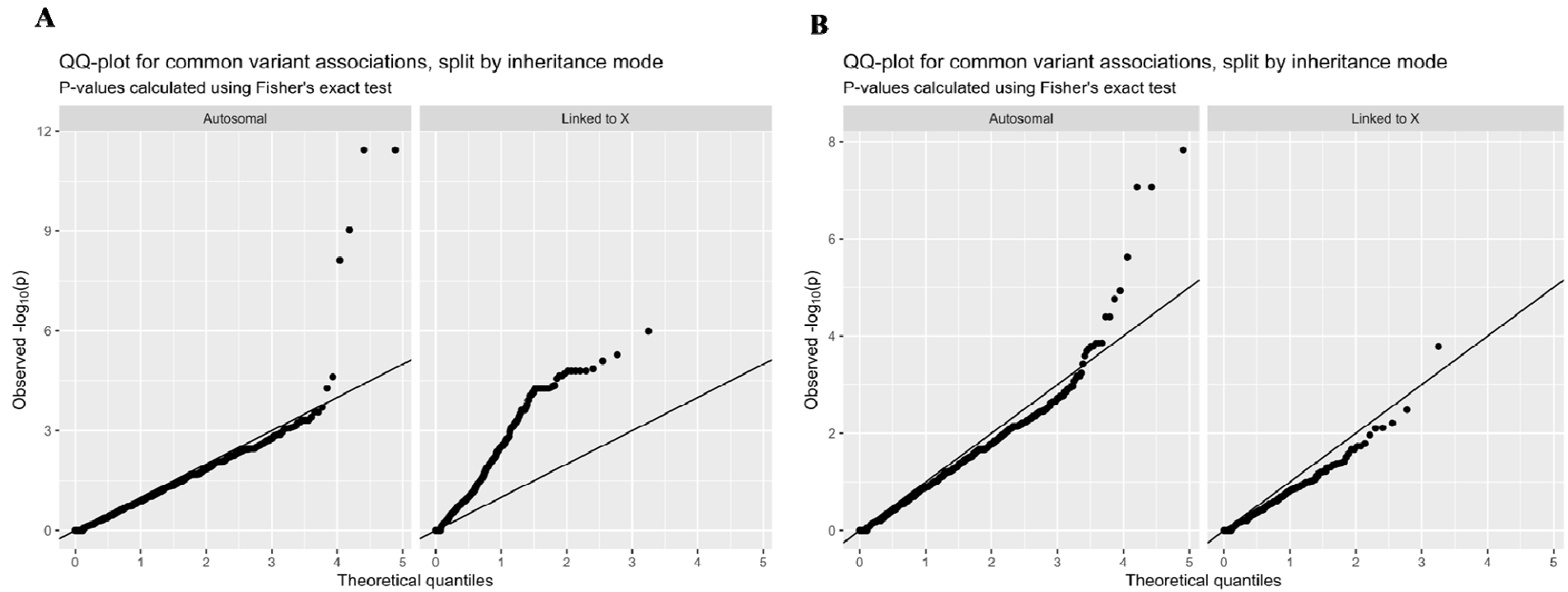
**ANEXO C - Defeitos monogênicos relacionados a susceptibilidade específica a condições causadas por infecções virais** (adaptado de Casanova, Su, and the COVID Human Genetic Effort, 2020).

<b>Patógeno (condição)</b>	<b>Gene</b>
Vírus Influenza (pneumonia grave)	<i>IRF7</i>
	<i>IRF9</i>
	<i>TLR3</i>
Rinovírus (pneumonia grave)	<i>IFIH1</i>
	<i>UNC93B1</i>
Herpes simplex vírus 1 (encefalite)	<i>TLR3</i>
	<i>TRIF</i>
	<i>TRAF3</i>
	<i>TBK1</i>
	<i>IRF3</i>
	<i>SNORA31</i>
Herpes simplex vírus 1, influenza, norovirus (encefalite tronco cerebral)	<i>DBR1</i>
	<i>TMC6</i>
Beta-papillomavirus (verrugas e câncer)	<i>TMC8</i>
	<i>CIB1</i>
	<i>SH2D1A</i>
Epstein-Barr vírus (hemofagocitose, linfoproliferação, linfoma, hipogamaglobulinemia)	<i>XIAP</i>
	<i>ITK</i>
	<i>MAGT1</i>
	<i>CD27</i>
	<i>CD70</i>
Varicella-zoster vírus (doença disseminada)	<i>POLR3A</i>
	<i>POLR3C</i>
Herpes virus-8 humano (Sarcoma de Kaposi)	<i>TNFRSF4</i>
Citomegalovírus (doença disseminada)	<i>NOS2</i>
Vírus da Hepatite A (hepatite fulminante)	<i>IL18BP</i>
Vacinas vivas atenuadas de sarampo ou febre amarela (doença disseminada)	<i>IFNAR1</i>
	<i>IFNAR2</i>
	<i>STAT2</i>
	<i>IRF9</i>

**ANEXO D - Controle de qualidade de variantes genéticas dos grupos A e B na análise de associação à Síndrome Congênita do Zika.**

	<b>Grupo A</b>	<b>Grupo B</b>
União dos kits de biblioteca	175.297 (110%)	162.216 (100%)
Kit de biblioteca Agilent	157.713 (90%)	147.887 (91,2%)
Kit de biblioteca Xgen	134.813 (76,9%)	125.938 (77,6%)
Intersecção dos kits de biblioteca	117.229 (66,9%)	111.609 (68,8%)
Taxa de genotipagem baixa	4.439 (2,5%)	4.301 (2,7%)
Variantes em desequilíbrio de Hardy-Weinberg	4 (0%)	1 (0%)
<b>Variantes avaliadas na análise</b>	<b>112.786 (64,3%)</b>	<b>107.307 (66,2%)</b>

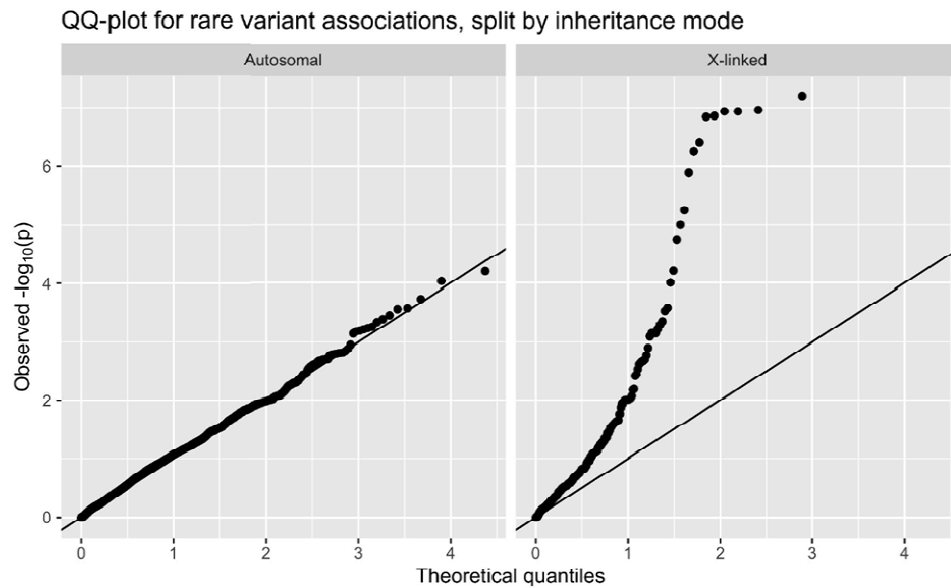
**Anexo E –Distribuição das variantes comuns observadas em relação a distribuição teórica (QQ plot).** O painel A corresponde às variantes do grupo de crianças expostas ao ZIKV e o painel B ao grupo de mães, em ambos é possível observar a diferença entre os valores observados e teóricos separadamente nos autossomos e no cromossomo X.





**Anexo F –Distribuição das variantes raras observadas em relação a distribuição teórica (QQ plot).** O painel A corresponde às variantes do grupo de crianças expostas ao ZIKV e o painel B ao grupo de mães, em ambos é possível observar a diferença entre os valores observados e teóricos separadamente nos autossomos e no cromossomo X.

**A**



**B**

