

**Jady Tamaio Guedes Ferrara**

**Febre amarela: pesquisa de polimorfismos do INF- $\lambda$  e  
associação com o desfecho da doença**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Professor Dr. Jorge Elias Kalil  
Filho

**São Paulo**

**2022**

**Jady Tamaio Guedes Ferrara**

**Febre amarela: pesquisa de polimorfismos do INF- $\lambda$  e  
associação com o desfecho da doença**

Dissertação apresentada à Faculdade de  
Medicina da Universidade de São Paulo para  
obtenção do título de Mestre em Ciências

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Professor Dr. Jorge Elias Kalil  
Filho

**São Paulo**

**2022**

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Ferrara, Jady Tamaio Guedes

Febre amarela : pesquisa de polimorfismos do INF- $\lambda$  e associação com o desfecho da doença / Jady Tamaio Guedes Ferrara. -- São Paulo, 2022.

Dissertação (mestrado)--Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Jorge Elias Kalil Filho.

Descritores: 1 Febre amarela 2.Polimorfismo genético 3.Fator regulador de interferon 3 4.Susceptibilidade genética 5. Resistência 6.Polimorfismo de nucleotídeo único

USP/FM/DBD-460/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **AGRADECIMENTOS**

Nunca saberemos o quão forte somos até que ser forte seja a única escolha. Assim, venho com muita alegria agradecer primeiramente a Deus por ter me mantido firme e me dado graça mesmo quando as minhas forças não existiam mais. Agradeço ao meu marido que sempre acreditou em mim, me apoiou com amor e empatia, seja emocionalmente ou financeiramente, me incentivando até o final - Sem você isso nunca teria existido! Agradeço aos meus pais por terem me dado a vida e condições para escolher sempre o que eu quisesse fazer.

Muito obrigada à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) e ao Programa de Alergia e Imunopatologia da Universidade de São Paulo por proporcionarem a realização de muitos dos meus sonhos. Agradeço ao meu orientador, o Prof.Dr. Jorge Kalil por ter me aceitado e sempre me tratado bem em todos esses anos, não me julgando, mas sim, me acolhendo. Não menos importante, agradeço à minha co-orientadora Dra. Amanda Frade por nunca desistir de mim, por acreditar e sempre me incentivar com alegria, mesmo quando apenas lágrimas me restavam. Obrigada por me acalmar em muitas das minhas crises e por estar ao meu lado não somente me ensinando, mas sim como um ser humano, me ouvindo com um ombro amigo e cheio de empatia.

Aos demais professores que me acompanharam nessa jornada, agradeço ao grupo TX da Prof.Dra. Verônica Coelho que sempre me recebeu com alegria e acrescentaram ao meu repertório acadêmico; a Dra. Karine Amicis que me preparou e iniciou ao meu lado nessa jornada maluca e a todo o grupo do Laboratório de Investigação Médica (LIM19) que acrescentaram uma peça nesse grande quebra-cabeças que foi os últimos anos.

## SUMÁRIO

Lista de abreviaturas, símbolos e siglas .....	Pág. 01
Lista de figuras .....	Pág. 04
Lista de tabelas .....	Pág. 05
Resumo .....	Pág. 06
Abstract .....	Pág. 07
<b>1 - Introdução .....</b>	<b>Pág. 08</b>
1.1. Febre Amarela .....	Pág. 08
1.2. Vírus da Febre Amarela .....	Pág. 11
1.3. Imunopatologia da Febre Amarela .....	Pág. 13
1.4. A Importância do IFN nas infecções virais .....	Pág. 14
1.5. A Importância dos SNPs em genes de IFN- $\lambda$ .....	Pág. 16
<b>2 - Objetivo .....</b>	<b>Pág. 17</b>
2.1. Geral .....	Pág. 17
2.2 Específicos .....	Pág. 17
<b>3 - Materiais e métodos .....</b>	<b>Pág. 18</b>
3.1. Desenho experimental e colaborações .....	Pág. 18
3.2. Aspectos éticos .....	Pág. 18
3.3. Amostras .....	Pág. 18
3.4. Seleção de polimorfismos .....	Pág. 19
3.5. Extração de DNA .....	Pág. 19
3.6. Genotipagem de SNPs do IFN- $\lambda$ .....	Pág. 20
3.7. Análise Estatística .....	Pág. 21
<b>4 - Resultados .....</b>	<b>Pág. 22</b>
<b>5 - Discussão .....</b>	<b>Pág. 29</b>
<b>6 - Conclusão .....</b>	<b>Pág. 33</b>
<b>7 - Referências .....</b>	<b>Pág. 34</b>
<b>8 - Anexos .....</b>	<b>Pág. 39</b>
8.1. Aprovação ética .....	Pág. 39
8.2. Dados brutos amostrais .....	Pág. 42
8.3. Genotipagem dos SNPs rs11881222 e rs4803217 .....	Pág. 50
8.4. Frequências alélicas mínimas (MAFs) completos .....	Pág. 51

## LISTA DE ABREVIATURAS, SÍMBOLOS E SIGLAS

**A** - Adenina

**APC** - Célula Apresentadora de Antígenos

**C** - Citosina

**CD** - Célula Dendrítica

**CEU** - Ancestralidade do Norte e Oeste da Europa

**Chi<sup>2</sup>** - Teste de Chi

**D'** - Estatística de Cohen

**DL** - Desequilíbrio de Ligação

**DNA** - Ácido desoxirribonucleico

**EUA** - Estados Unidos da América

**FA** - Febre Amarela

**FAS** - Febre Amarela Silvestre

**FAU** - Febre Amarela Urbana

**G** - Guanina

**GATA-3** - Fator de Transcrição GATA-3

**HCFMUSP** - Hospital Central da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

**HCV** - Vírus da Hepatite C

**HLA** - Antígeno Leucocitário Humano

**HVB** - Vírus da Hepatite B

**IC** - Intervalo de Confiança

**IFN** - Interferon

**IgE** - Imunoglobulina E

**IgM** - Imunoglobulina M

**IFNLR** - Receptor de Interferon Lambda

**IL** - Interleucina

**ISG** - Gene Estimulador de Interferon

**LCMV** - Coriomeningite Linfocítica

**LIM-19** - Laboratório de Investigação Médica 19

**MAF** - Frequência Alélica Mínima

**MHC** - Complexo Principal de Histocompatibilidade

**N** - Valor de N Amostral

**NFκβ** - Fator Nuclear Kappa B

**ng/μL** - Nanograma por Microlitro

**NK** - Natural Killer

**NO** - Óxido Nítrico

**OMS** - Organização Mundial da Saúde

**OR** - Odds Ratio

**p** - Valor de p

**PCR** - Reação da Cadeia de Polimerase

**pg/μL** - Picograma por Microlitro

**PNH** - Primatas Não Humanos

**PRR** - Receptor de Reconhecimento Padrão

**R<sup>2</sup>** - Coeficiente de Determinação

**RIG1** - Receptor de Reconhecimento por Padrão Citosólico

**RNA** - Ácido Ribonucleico

**ROR-γt** - Fator de Transcrição ROR- gama T

**RSV** - Vírus Sincicial Respiratório

**RT-PCR** - Reação da Cadeia de Polimerase em Tempo Real

**SNP** - Polimorfismo de Nucleotídeo Único

**STAT-3** - Fator de Transcrição STAT-3

**T** - Timina

**T-bet** - Fator de Transcrição T-bet

**TC** - Célula T Citotóxica

**TGF** - Fator de Crescimento Tumoral

**Th** - Célula T "Helper"

**TLR** - Receptor de Células T

**TNF** - Fator de Necrose Tumoral

**Treg** - Célula T Reguladora

**VFA** - Vacina da Febre Amarela

**WNV** - Vírus do Nilo Ocidental

**YRI** - Yoruba

**%** - Porcentagem

**60+** - Sessenta Anos ou Mais



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Ciclos epidemiológicos da Febre Amarela

**Figura 2** - Distribuição dos casos humanos confirmados de Febre Amarela de 2014 a 2019 no Brasil

**Figura 3** - Processo de viremia primária e secundária em diferentes órgãos e tecidos

**Figura 4** - Via de sinalização do Interferon-III ( $\lambda$ )

**Figura 05** - (Anexo) Gráfico de discriminação alélica da genotipagem do SNP rs11881222

**Figura 06** - (Anexo) Gráfico de discriminação alélica da genotipagem do SNP rs4803217

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg

**Tabela 2** - Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs11881222 e rs4803217

**Tabela 3** - Estudo de associação entre os SNPs e genótipos

**Tabela 4** - Resultado da distribuição absoluta e porcentagem dos genótipos dos SNPs rs11881222 e rs 4803217

**Tabela 5** - Frequências genotípicas entre vacinados e não vacinados (estratificados por infectados e não infectados)

**Tabela 6** - Relação entre a Vacinação contra Febre Amarela e os possíveis desfechos da FA

**Tabela 7** - Descrição estatística da faixa etária e etnia

**Tabela 8** - (Anexo) Dados brutos amostrais

**Tabela 9** - (Anexo) Frequências alélicas mínimas (MAFs) completos

## RESUMO

Ferrara JTG. Febre amarela: pesquisa de polimorfismos do INF- $\lambda$  e associação com o desfecho da doença [dissertação]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

A Febre Amarela é uma doença infecciosa, não contagiosa, transmitida por vetores artrópodes, cujo agente etiológico é um arbovírus do gênero Flavivirus. Como em outras doenças infecciosas, o vírus da Febre Amarela desencadeia amplas manifestações clínicas que podem variar desde uma infecção assintomática até a doença fatal. Já se é sabido que polimorfismos em genes da resposta imunológica inata, podem estar associados ao controle da carga viral e os IFN do tipo III podem regular a resposta inflamatória de células da imunidade inata. A falta na descrição de variantes em humanos que possam estar envolvidas no curso da doença é notável. Nosso objetivo foi identificar os polimorfismos genéticos associados à via de IFN-III capazes de interferir na resposta efetiva contra o vírus da Febre Amarela, conferindo maior resistência ou susceptibilidade à doença em humanos. Com uma coorte de 194 amostras, realizamos a genotipagem dos SNPs de IFN- $\lambda$  (rs11881222 e rs4803217) por RT-PCR. Após as análises, observamos que para ambos os SNPs estudados ao carregar o alelo variante G as chances de infecção para Febre Amarela são estatisticamente maiores. Dentro do grupo de infectados, o sexo masculino é estatisticamente mais atingido dentro da nossa coorte e os indivíduos não vacinados possuem maiores chances de infecção para a cepa selvagem. Com relação aos possíveis desfechos da doença, a vacinação é um fator de resistência para a sobrevivência da coorte estudada e os idosos são mais protegidos contra a doença quando comparados aos outros grupos etários, enquanto que os pretos são mais suscetíveis a infecção por Febre Amarela. A descrição de SNPs suscetíveis às complicações decorrentes da infecção viral, podem auxiliar na identificação de casos leves e graves, assim, norteados as decisões médicas e trazendo agilidade e prioridade no tratamento ao doente.

**Palavras-chave:** Febre amarela, Polimorfismo genético, Fator regulador de interferon 3, Susceptibilidade genética, Resistência, Polimorfismo de nucleotídeo único.

## ABSTRACT

Ferrara JTG. Yellow Fever: INF- $\lambda$  Polymorphisms and association with disease [dissertation]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2022.

Outcome Yellow Fever is an infectious, non-contagious disease transmitted by arthropod vectors, whose etiological agent is an arbovirus of the Flavivirus genus. As with other infectious diseases, the Yellow Fever virus triggers broad clinical manifestations that can range from an asymptomatic infection to a fatal illness. It is already known that polymorphisms in genes of the innate immune response may be associated with the control of viral load and type III IFNs can regulate the inflammatory response of innate immune cells. The lack of variants studies in humans that may be involved in the course of the disease is notable. Our objective was to identify genetic polymorphisms associated with the IFN-III pathway capable of interfering with the effective response against the Yellow Fever virus, conferring greater resistance or susceptibility to the disease in humans. We evaluate a cohort of 194 samples. Genotyping of IFN- $\lambda$  SNPs (rs11881222 and rs4803217) was performed by RT-PCR. For both SNPs studied the results showed when carrying the variant G allele, the chances of infection for Yellow Fever are statistically higher. Within the infected group, males are statistically more affected within our cohort and unvaccinated individuals are more likely to be infected with the wild-type strain. Regarding the possible disease outcomes, vaccination is a resistance factor for the survival of the studied cohort and the elderly subjects are more protected against the disease when compared to other age groups, while blacks are more susceptible to Yellow Fever infection. The analysis on SNPs to evaluate susceptibility to complications resulting from viral infection can help in the identification of mild and severe cases, thus guiding medical decisions and bringing agility and priority to the patients treatment.

**Keywords:** Yellow fever, Polymorphism genetic, Interferon regulatory factor 3, Genetic susceptibility, Resistance, Polymorphism single nucleotide.

## 1. Introdução

### 1.1. Febre Amarela

A Febre Amarela (FA) é uma doença infecciosa febril aguda, não contagiosa, endêmica e transmitida por vetores artrópodes, cujo agente etiológico é um arbovírus do gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (RNA de cadeia simples) (1). A infecção viral varia de quadros assintomáticos (acomete 50% dos indivíduos infectados), quadros leves ou moderados (com doença febril acompanhada ou não de icterícia - 30% dos casos), e quadros graves (casos de febre hemorrágica com falência hepática, insuficiência renal e morte - 20% dos casos) (2,3). O diagnóstico específico para FA, pode ser feito de forma direta (detecção do vírus em amostras clínicas de líquido, sangue ou tecido) ou indireta (detecção de anticorpos contra o vírus no líquido) e, a única forma preventiva para a doença é através da vacinação com o vírus atenuado (2,4).

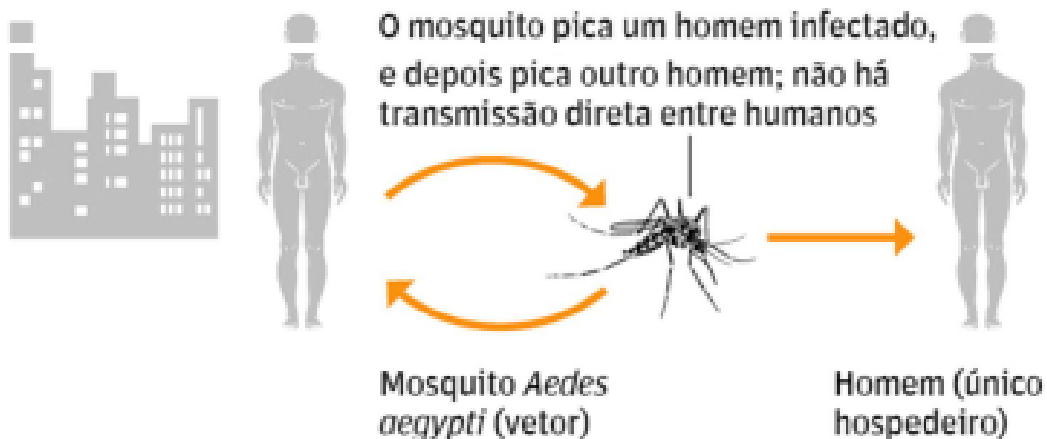
Do ponto de vista epidemiológico, a FA apresenta dois ciclos de transmissão, o silvestre e o urbano, como observado na Figura 1. O primeiro, é mais comumente encontrado em regiões tropicais endêmicas, e acontece quando o contato humano com vetores relacionados à manutenção do ciclo enzoótico viral ocorre. A forma urbana atualmente restrita a algumas regiões africanas, se caracteriza pela transmissão viral através de vetores adaptados ao ambiente urbano (5). Em ambos os ciclos a doença revela características idênticas do ponto de vista etiológico, clínico, imunológico e fisiopatológico (2). Nas Américas, os vetores do ciclo silvestre de maior importância são: *Haemagogus janthinomys*, *Haemagogus albomaculatus*, *Haemagogus leucocelaenus* e *Sabethes chloropterus* (1). O ciclo urbano da doença depende apenas da presença do mosquito *Aedes aegypti* (5).

Entre o século XVIII e o início do século XX a doença foi responsável por muitas mortes que só foram controladas após a identificação do vetor *Aedes aegypti* em 1900, resultando em um declínio expressivo de doentes fora das áreas tropicais endêmicas (6). A doença acomete predominantemente a África subsaariana e as regiões tropicais da América do Sul (4). Sua importância epidemiológica advém do seu elevado potencial de disseminação, de sua gravidade clínica e do risco de reurbanização da transmissão.

**1 Silvestre**  
O mais comum; ocorre em áreas rurais e de mata



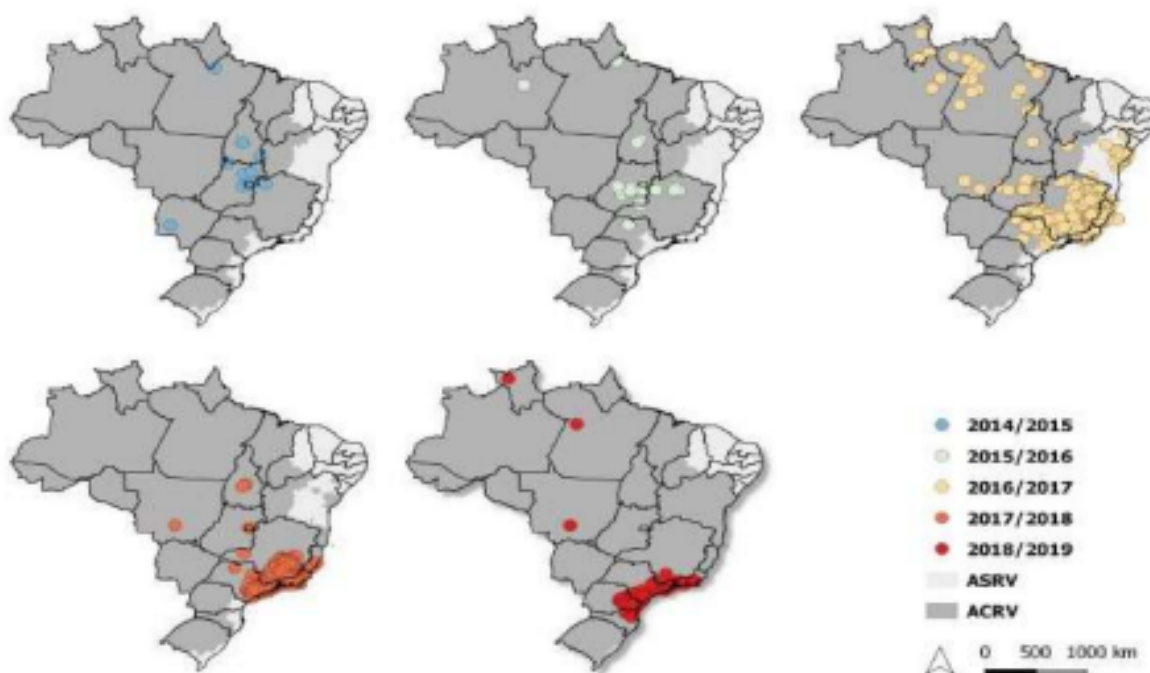
**2 Urbano**  
Não é registrado no Brasil desde 1942



**Figura 1 - Ciclos epidemiológicos da Febre Amarela:** Os ciclos epidemiológicos de transmissão da Febre Amarela, silvestre e urbana, são distintos. No ciclo silvestre, os primatas não humanos (macacos) são os hospedeiros e amplificadores do vírus, e os vetores são mosquitos com hábitos estritamente silvestres. Nesse ciclo, o homem participa como um hospedeiro acidental. No ciclo urbano, o homem é o único hospedeiro com importância epidemiológica e a transmissão ocorre a partir de vetores urbanos infectados. Fonte: Ministério da Saúde - Governo do Brasil (6).

O maior período de transmissão - período sazonal - da FAS (Febre Amarela Silvestre) no Brasil, ocorre de dezembro a maio. Entretanto, surtos da doença podem ocorrer com periodicidade irregular podendo se dispersar além dos limites endêmicos, quando o VFA encontra condições favoráveis como temperaturas elevadas, pluviosidade, alta densidade de vetores e de hospedeiros primários, além

de ter hospedeiros susceptíveis e uma baixa cobertura vacinal (7). No Brasil, não há ocorrência de FAU desde 1942 (8). Entretanto, nos últimos anos, o ciclo silvestre tem se manifestado como uma doença reemergente em diversos municípios brasileiros. Desde 2016, um número crescente de casos de FAS na região sudeste do país vêm culminando em surtos de proporções alarmantes (Figura 2).



**Figura 2 - Distribuição dos casos humanos confirmados de Febre Amarela de 2014 a 2019 no Brasil:** Distribuição dos casos humanos e/ou epizootias em PNH confirmados durante a reemergência extra-Amazônica de Febre Amarela, de acordo com o período de monitoramento, julho de 2014 a julho de 2019 - Brasil. Fonte: Coordenação-Geral da Vigilância das Arboviroses (CGARB/DEIDT/SVS). Saúde Brasil 2019: uma análise da situação de saúde com enfoque nas doenças imunopreveníveis e na imunização (8).

Os primeiros casos destes surtos foram registrados no Estado de Minas Gerais em dezembro de 2016, com rápida expansão para os Estados de São Paulo, Rio de Janeiro e Espírito Santo (8). Segundo o boletim epidemiológico do Ministério da Saúde, entre julho de 2014 e junho de 2019 foram notificadas 19.174 epizootias em primatas não humanos suspeitos, das quais 1.437 foram confirmadas laboratorialmente. No mesmo período, 13.949 casos humanos suspeitos foram notificados e 2.259 foram confirmados, com 773 óbitos e letalidade de 34,2%, sendo a maioria destes casos na região sudeste (9). São Paulo, mesmo não sendo a princípio considerada uma área endêmica para a FA, vêm registrando a presença do vírus desde 2016, o que impactou a saúde pública regional. A partir de novembro de 2019, a frequência de confirmações aumentou, com a dispersão do vírus para o Sul

do país (atingindo o oeste do Paraná e litoral de Santa Catarina) (9). Tais dados reforçam a necessidade de manutenção das medidas de controle epidemiológico além de uma eficaz redistribuição da vacina - único meio de prevenção à doença - já que, com o retorno do período sazonal, é de se esperar que casos humanos voltem a acontecer.

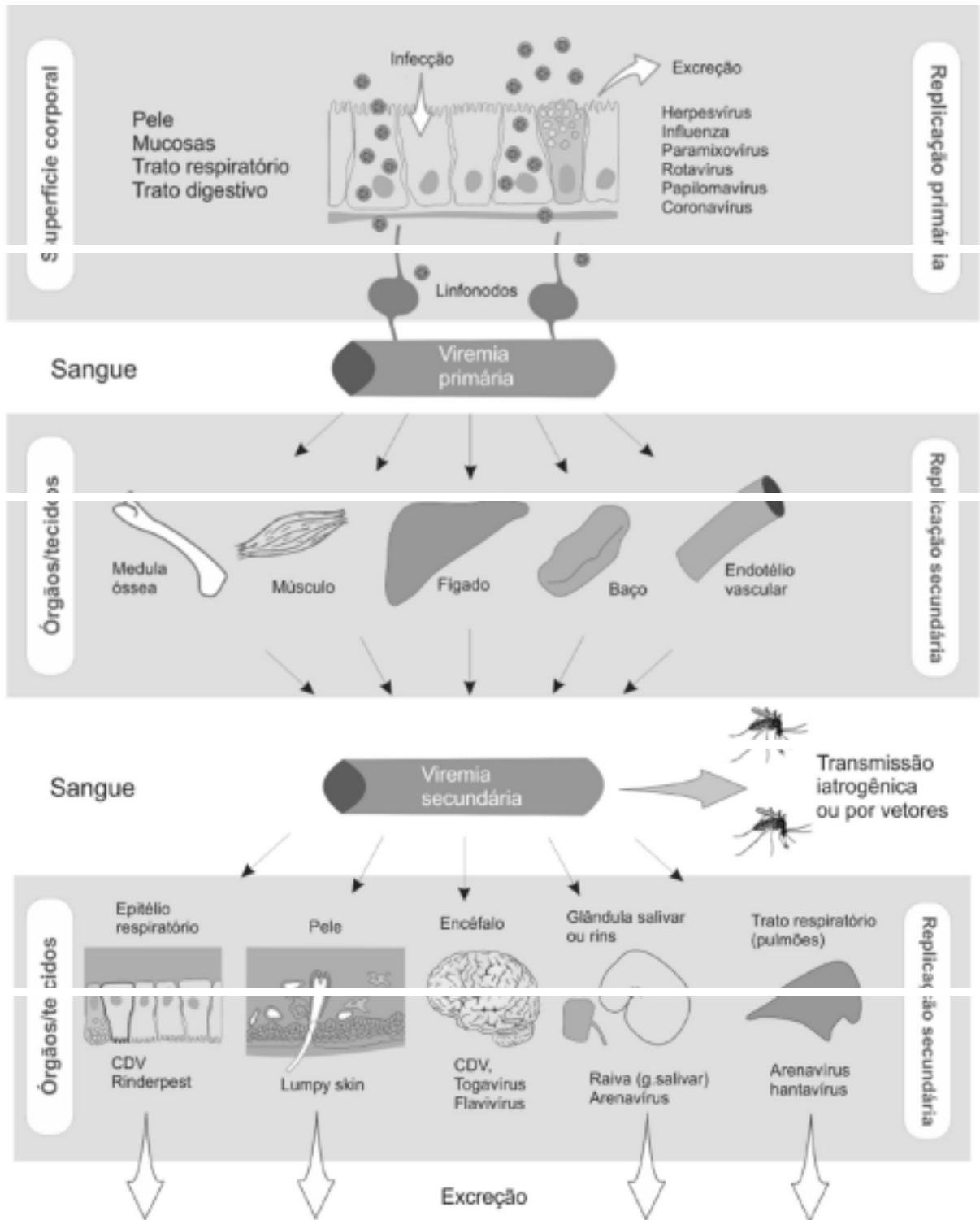
## **1.2. Vírus da Febre Amarela**

O vírus da Febre Amarela (VFA) é um vírus do gênero Flavivirus formado por fita simples de RNA. Ele está intimamente relacionado com outros patógenos humanos transmitidos por mosquitos, como o vírus da Dengue, Zika, Febre do Nilo Ocidental, Rocio, Encefalite de Saint Louis e Encefalite Japonesa (10,11). Seu genoma tem 10.233 nucleotídeos que codificam três proteínas estruturais (prM, E e C) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5). Tais proteínas estão presentes na partícula viral madura, que é constituída pelo nucleocapsídeo envolvido por um envelope viral. Por outro lado, as proteínas não estruturais estão associadas à replicação viral nas células infectadas (1).

A cinética de replicação do VFA durante a infecção humana não está completamente elucidada, assim, diversas lacunas no conhecimento sobre este tema continuam abertas. Atualmente, os dados relativos à cinética viral são amplamente baseados na opinião de especialistas e em dados provenientes de uma série de casos com reduzido tamanho amostral (12-15). Após a transmissão, o VFA ganha acesso à corrente sanguínea e atinge os linfonodos regionais, infectando principalmente macrófagos e células dendríticas (CDs). O vírus se apropria da maquinaria celular existente de modo a proliferar-se com a multiplicação e reprodução viral (parasitas intracelulares obrigatórios) (13,14).

Viremia é a denominação da presença de partículas virais no sangue. Ela pode ser classificada como ativa ou passiva. A forma ativa é resultado da replicação viral nos tecidos e órgãos do hospedeiro, tal forma atinge o hospedeiro com maior magnitude e duração. Já a forma passiva, resulta da introdução do vírus diretamente no sangue (inoculação direta por insetos hematófagos ou por transfusão sanguínea) (3,16). Tais formas dependem, portanto, do tipo de infecção viral, do tropismo, da patogenicidade e do fator de virulência (Figura 3).





**Figura 3 - Processo de viremia primária e secundária em diferentes órgãos e tecidos:** Etapas da patogenia das infecções virais localizadas e sistêmicas: papel da viremia na disseminação das infecções (16).

O período de viremia representa a fase de maior infectividade, coincidindo com o início da fase prodrômica da doença. O período de incubação, caracterizado pelo tempo entre a picada do mosquito e o início dos primeiros sintomas, é descrito

como sendo de três a seis dias, podendo chegar a 10 dias (17).

### **1.3. Imunopatologia da Febre Amarela**

O VFA é principalmente viscerotrópico, cujo órgão alvo é o fígado, seguido pelos rins, baço, linfonodos e coração (18). No fígado, o vírus se liga à superfície das células hepáticas induzindo a apoptose (morte celular mediada por TGF- $\beta$ ) e a necrose lítica que, combinada com a esteatose (acúmulo de gordura no fígado), resulta em danos hepáticos comumente observados durante as infecções virais (17,19). Estudos em humanos mostraram que a ocorrência de apoptose é mais proeminente do que a necrose no fígado de casos fatais da doença (20). Por outro lado, os quadros de choque circulatório, mais frequentes nas fases tardias da doença, são provavelmente mediados pela desregulação da produção de citocinas inflamatórias (21). A resposta inflamatória durante a infecção pelo VFA no tecido hepático é caracterizada por ser do tipo Th1 que se inicia quando as células infectadas são lisadas por linfócitos T CD8+ (citotóxicos) e/ou por células NK (do inglês, Natural Killer), assim liberando seus antígenos virais além de bilirrubina no meio extracelular e causando icterícia. Tal fato origina o nome da doença “Febre Amarela” (5).

Além da participação dos diferentes grupos celulares na imunopatologia da FA, o envolvimento das citocinas modula o curso das respostas imunológicas que permeiam a doença. A subpopulação Th1 é a grande produtora de IFN- $\gamma$ , um mediador necessário para uma resposta imunológica efetiva contra patógenos intracelulares (vírus e certos parasitas unicelulares) (20). O fator de transcrição desse subgrupo é o T-bet, o qual induz a transcrição de genes que se codificam para produção de IFN- $\gamma$  (22,23). As células dendríticas (CD), também, detectam antígenos virais (S100) através de receptores de reconhecimento padrão (PRRs) e se ativam mesmo que em baixas concentrações de interferon do tipo I (IFN-I). Essa ativação estimula a transcrição de genes da imunidade inata, como o NF- $\kappa$ B, a produzirem mediadores solúveis aptos a modular as respostas adaptativas subsequentes (20).

Concentrações excessivas de TNF- $\alpha$  resultam no aumento da atividade citolítica de células T CD8+ e em lesão hepática, assim, evidenciando o papel crítico dessas citocinas na patogênese do choque e lesão tecidual durante FA (4,24). Outras citocinas como a IL-6, IFN- $\gamma$  e o TGF- $\beta$  também foram detectadas no fígado

de indivíduos que sucumbiram à FA (17,25). Esses mediadores também podem estar envolvidos na intensa vasculopatia observada nos casos mais graves da doença (26). Ao replicar-se nas células, o VFA ativa genes codificantes da via dos IFNs (especificamente do tipo I) a produzirem IFN- $\alpha$ , com a finalidade de impedir a replicação do vírus em outras células (4). O IFN do tipo II ( $\gamma$ ) é induzido por IL-12 e IL-18, produzidas pelas células T auxiliares CD4+, CD8+ e por células NK após estimuladas por antígenos virais (27). O IFN- $\gamma$  está relacionado com a regulação das respostas inflamatórias, dado tal que reforça a hipótese de que um desequilíbrio na produção dessa citocina pode contribuir para o desenvolvimento de autoimunidade (13).

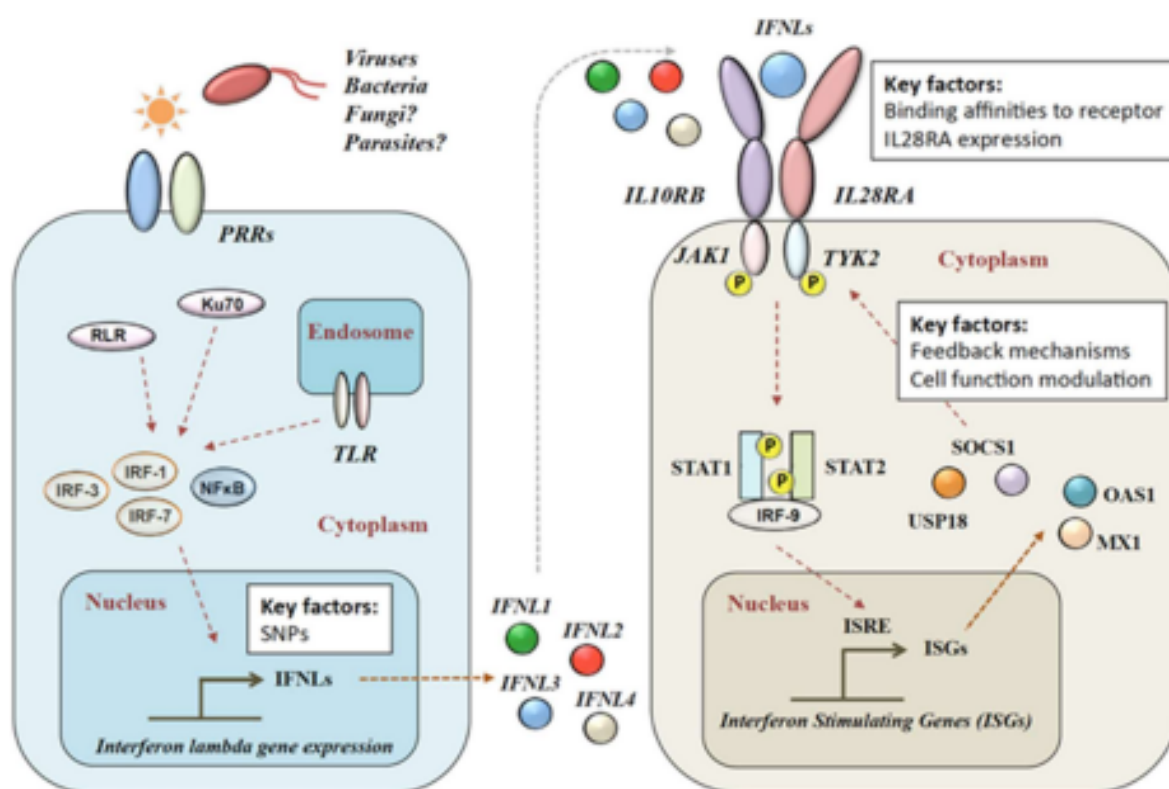
Como vimos, a resposta imunológica ao VFA apresenta componentes tanto da resposta imunológica celular como humoral. Contudo, estudos mostraram uma diferença na resposta imune contra a cepa vacinal e a selvagem em experimentos com células humanas *in vitro*, sugerindo que a imunidade celular desempenha um papel mais relevante na depuração viral e na limitação da progressão da infecção. Comparada à cepa vacinal, a cepa selvagem do VFA desencadeia menor estímulo ao sistema imunológico inato e menor ativação de células TCD4+. O escape viral à estimulação da imunidade inata parece representar o motivo pelo qual o sistema imune não consegue conter a disseminação do vírus selvagem. Esse evento pode ser facilitado por respostas imunológicas ineficientes (22,28).

#### **1.4. A Importância do IFN nas infecções virais**

Os interferons (IFN) são glicoproteínas naturais preferencialmente produzidas pelas CD, pertencentes à classe dos mediadores solúveis secretados por leucócitos e fibroblastos (28). Produzidos na fase inicial da infecção viral, os IFNs constituem a primeira linha de resistência ao agente infeccioso (29-35) com uma ação antiviral sobre os hepatócitos e monócitos, realizando assim um link entre a imunidade inata e a imunidade adaptativa (24). Existem três tipos de interferons: IFNs tipo I ( $\alpha$  e  $\beta$ ); do tipo II ( $\gamma$ ) e do tipo III ( $\lambda$ ). Em foco nesse trabalho, os IFN do tipo III ( $\lambda$ ) também conhecidos como IL-28A; IL-28B e IL-29, apresentam atividade anti-proliferativa na regulação antiviral e interagem com um receptor heterodimérico de classe II - que consiste em um receptor de IL-10 (33).

O estímulo ideal de interferon no controle da infecção viral, evitando simultaneamente o desenvolvimento de imunopatologias ao hospedeiro, é

fundamental para uma resposta imunológica efetiva contra o patógeno. Inicialmente, foi demonstrado que os IFN- $\lambda$  induzem a expressão de genes estimuladores de interferon a exercerem propriedades antivirais de maneira semelhante a IFNs tipo I. O IFN- $\lambda$ , também, é descrito sendo o protagonista da resposta imunológica na infecção pelo vírus da Hepatite C (HCV) (36,37), participando das múltiplas vias de cascatas de sinalização intracelular que ocorrem após a detecção viral pelos PRRs que, ao se ligarem no receptor heterodímero IFNLR, desencadeiam a sinalização JAK-STAT indutora de genes, os ISGs do inglês Interferon Stimulated Genes, conforme ilustrado na figura 4 (38-40).



**Figura 4 - Via de sinalização do Interferon-III ( $\lambda$ ):** RLR, receptor do tipo RIG-1; TLR, receptores do tipo Toll; NF- $\kappa$ B, fator nuclear potencializador da cadeia leve kappa das células B ativadas; IL28RA, receptor alfa da interleucina 28; IL10RB, receptor beta de interleucina 10; JAK1, Janus Kinase 1; TYK2, tirosina quinase 2; STAT, transdutor de sinal e ativador de transcrição; IRF, fator regulador do interferon; ISRE, elemento de resposta estimulada por interferon; MX1, proteína de ligação ao GTP induzida por interferon Mx1; OAS1, 2'-5'-oligoadenilato sintetase (39).

A sinalização da via do IFN tipo III, em contraste com a sinalização da via do IFN-I induz, geralmente, um conjunto limitado de genes estimuladores de interferons, promovendo uma resposta imunológica moderada em contraste com a ampla resposta inflamatória do tipo I. Ao contrário do receptor de IFN-I expresso em quase

todas as células nucleadas, a expressão do receptor de IFN-III é restrita, principalmente, às superfícies epiteliais como trato respiratório (20), trato gastrointestinal (41), barreira hematoencefálica (42,43), e a um pequeno painel envolvendo outros tipos celulares (43,44). A atividade antiviral promissora do IFN- $\lambda$  foi visada, levando à diversos estudos de ensaios clínicos para o vírus da hepatite C, vírus da hepatite B, vírus influenza, rinovírus, RSV, LCMV, rotavírus, norovírus, WNV e pacientes infectados pelo vírus da hepatite D (44). Muitos desses estudos de respostas antivirais de IFN- $\lambda$  têm sido focados em vírus que infectam o fígado, além dos demais epitélios citados anteriormente, para causar uma infecção viral neuro-invasiva.

### **1.5. A Importância dos SNPs em genes de IFN- $\lambda$**

Estudos de polimorfismos de nucleotídeo único (SNP) em genes do IFN- $\lambda$  estão fortemente associados aos desfechos das infecções virais. Os SNPs são variações na sequência de DNA que afetam somente uma base - adenina (A), timina (T), citosina (C) ou guanina (G) - na sequência do genoma (45). Encontrados por todo o DNA humano, os SNPs representam as variações mais comuns no genoma humano e desempenham um importante papel em diversos estudos. Mesmo que não afetando diretamente a saúde ou desenvolvimento de um indivíduo, quando há SNPs dentro ou próximos a uma região reguladora, eles são capazes de desempenhar um papel direto na doença após afetar o gene relacionado (46).

Para uma otimização nas pesquisas em SNPs, uma das abordagens mais utilizadas é a de Tag SNPs. Esse estudo de Tag é uma estratégia para identificar genes que estão em desequilíbrio de ligação, onde conseguimos estudar um número suficiente/limitado de SNPs que reflete todo um bloco de variantes que estão sendo herdadas em conjunto (48). Esses SNPs herdados em blocos são variações alélicas em alto DL (Desequilíbrio de ligação) - associação não aleatória entre alelos de diferentes *loci* em uma população (47,48).

A hipótese dessa pesquisa é que polimorfismos presentes no interferon do tipo III sejam possivelmente associados ao desfecho fatal da Febre Amarela, caracterizando genótipos de suscetibilidade à doença.

## **2. Objetivo**

### **2.1. Geral**

Identificar polimorfismos no gene IFN- $\lambda$  que possam estar relacionados na resposta imunológica efetiva contra o vírus da Febre Amarela, conferindo maior resistência ou susceptibilidade à doença em humanos.

### **2.2. Específicos**

- I. Identificar os polimorfismos envolvidos e selecioná-los de acordo com estudos associados aos Flavivirus nos diferentes grupos amostrais;
- II. Correlacionar os achados entre as diferentes formas da doença com os desfechos clínicos e vacinação.

### **3. Materiais e Métodos**

#### **3.1. Desenho experimental e colaborações**

Trata-se de um estudo observacional retrospectivo, parte integrante de um grande estudo retrospectivo organizado em colaboração com outras instituições em São Paulo (Instituto de Infectologia Emilio Ribas, Instituto Adolfo Lutz e Centro de Vigilância Epidemiológica da Secretaria de Saúde do Estado de São Paulo), coordenada pelo Prof. Jorge Kalil, diretor do Laboratório de Imunologia do InCor – HCFMUSP, instituição na qual o presente estudo foi realizado.

#### **3.2. Aspectos Éticos**

Este estudo foi aprovado na Comissão de Ética para Análise de Estudos de Pesquisa do HCFMUSP (3.944.812) conforme o Anexo 1. No estudo, foi aplicado o termo de consentimento em todos os indivíduos recrutados e elegíveis. Para comprovação da vacinação, foi exigido o comprovante vacinal que foi fotografado e arquivado.

#### **3.3. Amostras**

Este estudo foi realizado com um total de 194 amostras; 91 são os casos de óbitos decorrentes de Febre Amarela, 53 representam os casos sobreviventes da doença e 50 controles (indivíduos sem infecções virais ativas pré-estabelecidas). Os principais dados, gênero, etnias e tecidos de extração de DNA das amostras seguem no Anexo 2. A variável de desfecho estudado foi a susceptibilidade e resistência, além da letalidade por Febre Amarela.

A coorte retrospectiva dos casos foi cedida pelo colaborador Dr. Esper Kallás e pelo Dr. Paolo Zanotto. Os controles foram doados, após a tipagem HLA feita, do banco de sangue do setor de transplantes de medula óssea (HLA - Laboratório de Investigação Médica LIM-19). Todas as amostras foram armazenadas em um biorrepositório, conforme regulamento e normas técnicas, éticas e operacionais pré-definidas, sem fim comercial.

Os critérios clínicos consideraram a presença de um ou mais dos seguintes sinais e sintomas: febre, cefaléia, dor retro-ocular, mialgia, artralgia, edema ou outros sinais inflamatórios articulares, exantema maculopapular ou petequial com, ou sem prurido, fenômenos hemorrágicos, conjuntivite não purulenta ou hiperemia

conjuntiva. Os critérios de inclusão foram: ser residente ou ter visitado áreas com surto de Febre Amarela, ou epizootia até duas semanas antes do início dos sintomas, ou que tenha vínculo epidemiológico com caso confirmado.

### **3.4. Seleção de polimorfismos**

Os SNPs de IFN- $\lambda$  escolhidos (rs11881222 e rs4803217) foram selecionados com base nos dados do HapMap para as etnias caucasiana (CEU) e populações iorubás (YRI). Ambos os SNPs estão presentes em uma relação de Tag SNPs mapeados através do programa Ensembl genome browser (<https://www.ensembl.org/index.html>) e selecionados por meio do programa de análise em bioinformática Haploview (<https://www.broadinstitute.org/haploview/haploview>). A partir da abordagem de TAG SNPs levantamos as variantes alélicas com uma frequência alélica mínima (MAF) de igual ou maior a 20% na população Européia (CEU) e Africana (YRI).

Para o gene de interesse, nas condições elucidadas acima, encontramos 4 tags SNPs de interesse para ambas as populações (CEU e YRI) entretanto, no início do projeto, escolhemos os rs11881222 e rs4803217, presentes em ambas as listagens de Tag SNP para realizarmos as genotipagens. Vale salientar que ambos os SNPs não são totalmente independentes ( $D'=0,55$   $R^2=0,24$ ) e, não existem estudos de polimorfismos genéticos para a doença Febre Amarela (susceptibilidade ou resistência), portanto cada descrição e dados nesse contexto se fazem necessárias para o meio científico e epidemiológico.

### **3.5. Extração de DNA**

A extração do DNA foi feita utilizando o kit QIAamp (Qiagen, EUA - lot 163015090 ref 51306). Foram utilizados 200 mL de sangue total para a extração de DNA. Sua quantificação foi realizada pelo fluorômetro Qubit da Invitrogen (Qubit Fluorometric Quantification - Invitrogen). Mais preciso do que o Nanodrop, os corantes fluorescentes Qubit emitem sinais apenas quando ligados às moléculas-alvo específicas (DNA ou RNA), mesmo na presença de nucleotídeos livres, ácidos nucleicos degradados ou contaminantes proteicos. O kit utilizado foi o: Qubit 1X dsDNA HS Assay (catálogo nº Q33230). O ensaio de quantificação é projetado para ser preciso em concentrações de amostra iniciais de 10 pg/ $\mu$ L a 100 ng/ $\mu$ L. Algumas amostras foram diluídas e outras foram concentradas, para atingir



aproximadamente a concentração de 20 ng/μl, recomendada pelo fabricante. A integridade do DNA foi confirmada em gel de agarose.

### 3.6. Genotipagem de SNPs do IFN- λ

Foram analisados nesse estudo os seguintes polimorfismos do tipo SNP: rs11881222 A/G e rs4803217 C/G, ambos para o gene do interferon lambda do tipo III. A tipificação (detecção de cada variante alélica) foi realizada por meio da amplificação dos TagSNPs (TaqMan SNP Genotyping Assay) por PCR em Tempo-Real (RT-PCR). Um tag SNP é um polimorfismo de nucleotídeo único representativo em uma região do genoma com alto desequilíbrio de ligação e são úteis em estudos de associação de SNPs de genoma completo. O RT-PCR combina amplificação e detecção por PCR em uma única etapa. Com essa metodologia, os corantes fluorescentes são usados para identificar os produtos da reação em cadeia da polimerase durante o ciclo térmico. Cada ensaio TaqMan permite a genotipagem de indivíduos para um único SNP. Nele contém: primers específicos para amplificar a sequência polimórfica de interesse; duas sondas de ligantes de ranhura menor TaqMan® (MGB) com supressores não fluorescentes (NFQ); uma sonda com etiqueta VIC™ para detectar a sequência do Alelo 1 ancestral, e uma sonda marcada com FAM™ para detectar a sequência do Alelo 2 variado.

A variação do SNP rs11881222 ocorre através da substituição (transição) de Adenina (A) - Alelo 1, por uma Guanina (G) - Alelo 2. Sua sequência de contexto [VIC/FAM] é:

GAGGGCACAGCCAGTGTGGTCAGGT[A/G]GGAGCAGAGGGAAGGGGTAGCAGG

T - Acesso através do site:

[https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C\\_\\_438138](https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C__438138)

16\_10?CID=&ICID=&subtype=. Já o polimorfismo de rs4803217, ocorre através da substituição (transversão) de uma Citosina (C) - Alelo 1, por uma Guanina (G) -

Alelo 2. Sua sequência de contexto [VIC/FAM] é

AGCGACTGGGTGACAATAAATTAAG[C/A]CAAGTGGCTAATTTATAAATAAAT -

Acesso através do site:

[https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C\\_\\_279227](https://www.thermofisher.com/order/genomelibrary/details/genotyping/C__279227)

35\_10?CID=&ICID=&subtype=.

Os experimentos foram realizados com amostras em duplicata dos três grupos de estudo (Óbitos, Sobreviventes e Controles), para ambos os SNPs

estudados. Elas foram distribuídas em placas adequadas (96 poços - 0,1 ml), para o equipamento Applied Biosystems StepOnePlus Real-Time PCR Systems Thermal Cycling. A análise dos experimentos foi realizada no aplicativo de genotipagem em nuvem da Thermo Fisher que é um programa independente (Thermo Fisher Connect - acessado pelo site: <https://apps.thermofisher.com/apps/spa/#/apps>). De forma unificada, o programa online Cloud uniu as corridas às analisando juntas, assim permitindo a normalização dos resultados.

### **3.7. Análise Estatística**

Para a análise dos dados foi aplicado o teste exato de Fisher e calculado o valor de p. Foram consideradas significativas diferenças com  $p < 0,05$ . Para dimensionar o tamanho do efeito foi calculado o Odds ratio (OR) e o intervalo de confiança de 95% (95% CI). Utilizamos o software SPSS Statistics v. 17.0 (IBM, Armonk, EUA). Em análises multivariadas, os polimorfismos, faixas etárias, etnia, tempo de duração da doença, vacinação e sexo foram incluídos como covariáveis. Todas as covariáveis são analisadas ao mesmo tempo. Em uma abordagem passo a passo, a pior co-variável associada (não significativa) é removida e a análise é executada novamente para manter apenas as covariáveis associadas significativas.

#### 4. Resultados

A genotipagem de ambos os SNPs do IFN- $\lambda$  (rs11881222 e rs4803217) foram realizadas de forma satisfatória, visto que a detecção dos alelos foram verificadas corretamente em todas as amostras analisadas - em anexo nos gráficos analíticos de discriminação alélica do programa Cloud (Thermo Fisher, EUA) - (Anexo 3). Ambos os SNPs estão em equilíbrio consistente com a lei de Hardy Weinberg no nível de significância: 0,05 (Tabela 1).

**Tabela 1:** Teste do equilíbrio de Hardy-Weinberg

GENE	Tag SNP	Chi <sup>2</sup>	p
IFN- $\lambda$	rs11881222 A/G	0.61728	0.73444
	rs4803217 C/G	4.06838	0.13079

Em relação ao rs11881222, das 194 amostras genotipadas, 92 indivíduos (47,4%) são heterozigotos (A/G); 03 (1,5%) são homozigotos GG (alelo variante) e 99 (51,0%) são homozigotos AA (alelo ancestral) e apresentaram a Frequência Alélica Mínima (MAF) = 0,253 (alelo GG com menor frequência), como observado na Tabela 2. Quando analisamos as frequências alélicas dos grupos Infectados e controles em relação aos genótipos vemos que: No grupo controle, 40 (80%) são do genótipo AA; 10 (20%) são AG e 0 (0%) são GG. No grupo dos infectados pelo VFA, 59 (40,97%) são AA; 82 (56,94%) são AG e 3 (2,08%) são GG.

**Tabela 2:** Frequências alélicas e genotípicas dos SNPs rs11881222 e rs4803217

GENE IFN- $\lambda$	Genótipo	Frequência n (%)	Controle n (%)	Infectados n (%)
rs11881222 MAF= 0,253	AA	99 (51)	40 (80)	59 (40,9)
	AG	92 (47,4)	10 (20)	82 (56,9)
	GG	3 (1,5)	0 (0)	3 (2)
rs4803217 MAF= 0,296	CC	93 (47,9)	93 (100)	0 (0)
	CG	87 (44,8)	0 (0)	87 (86,1)
	GG	14 (7,2)	0 (0)	14 (13,8)

Legenda: MAF – Frequência Alélica Mínima / n – número absoluto

Ao observarmos os dados do SNP rs4803217, das mesmas 194 amostras genotipadas, 87 indivíduos (44,8%) são heterozigotos; 14 indivíduos (7,2%) são homozigotos GG (alelo variante) e 93 indivíduos (47,9%) são homozigotos AA (alelo ancestral) - MAF 0,296 (alelo GG com menor frequência - Tabela 2). Observamos que em tal SNP, no grupo controle, 93 (100%) são do genótipo AA. Já no grupo dos indivíduos infectados, 87 (86,1%) são do genótipo CG e 14 (13,8%) possuem o genótipo GG. Como havia um baixo número de indivíduos com o genótipo GG em ambos os SNPs, para a realização da análise de dados associamos em um único grupo os genótipos AG+GG no rs11881222 e para o rs4803217, associamos os genótipos CG+GG conforme demonstrado na Tabela 3.

**Tabela 3:** Estudo de associação entre os SNPs e genótipos

<b>GENE</b>	<b>Tag SNP</b>	<b>Grupos genotípicos</b>	<b>Nível de significância</b>	<b>Odds Ratio</b>	<b>Intervalo de confiança 95%</b>
<b>IFN-λ</b>	rs11881222 A/G	AA vs AG+GG	p=7,9E-06	OR=2,401	95%CI: 1,635 - 3,5250
	rs4803217 C/G	CC vs CG+GG	p=4,3E-04	OR=1,860	95%CI: 1,317 - 2,6272

Um dado importante é que 85 dos 95 indivíduos que carregam a variante G para o SNP rs11881222 (alelo variado), foram infectados pelo VFA e tal diferença foi estatisticamente significativa em uma análise univariada da genotipagem com os grupos controle e infectados ( $p=7,9 \times 10^{-06}$ ; OR= 2,401; IC= 1,635 - 3,525). Tal dado nos mostra que ao carregar o alelo G o risco de ser infectado é 2,4 vezes maior (Demonstrado na Tabela 3 e 4). Da mesma forma, no SNP rs4803217, observamos que a tendência de mais infectados pelo VFA que apresentam o alelo variado (G), também existe ( $p=4,3 \times 10^{-04}$ ; OD=1,860; IC= 1,317 - 2,627). Após uma análise variada do SNP rs11881222, observamos que o indivíduo que carrega a o alelo G apresenta o risco de infecção aumentada de 2,5 x maior ( $p=6,8 \times 10^{-06}$ ; OR= 2,537; IC 1,691 - 3,806) que se mantêm estatisticamente significante após a inclusão do sexo como uma co-variável ( $p=3,7 \times 10^{-04}$ ; OD=0,222; IC= 0,097 - 0,509). Assim, o fato de ser do sexo masculino aumenta a chance de infecção na razão de 1/0,222, ou seja, 4,5 vezes mais as chances de infecção conforme podemos ver na tabela 4.

**Tabela 4:** Resultado da distribuição absoluta e porcentagem dos genótipos dos SNPs rs11881222 e rs 4803217.

Gene	SNP	genótipo	Análise univariada entre controles e infectados		Análise multivariada (sexo como co-variável)		Análise multivariada Feminino vs infecção		Análise multivariada Masculino vs infecção	
			Controles	Infectados	Feminino	Masculino	Controle	Infectado	Controle	Infectado
IFN-λ	rs11881222	AA	40 (80%)	59 (40,9%)	21 (53,8%)	78 (50,3%)	14 (73,7%)	7 (35%)	26 (83,9%)	52 (41,9%)
		AG+GG	10 (20%)	85 (40,9%)	18 (46,2%)	77 (49,7%)	5 (26,3%)	13 (65%)	5 (16,1%)	72 (58,1%)
	rs4803217	CC	35 (70%)	58 (40,3%)	75 (48,4%)	18 (46,2%)	11 (57,9)	7 (35%)	24 (77,4%0	7 (22,6%)
		CG+GG	15 (30%)	86 (59,7%)	80 (51,6%)	21 (13,5%)	8 (42,1%)	13 (65%)	51 (41,1%)	73 (58,9)

Outra forma importante na análise dos resultados está na relação dos indivíduos vacinados e que foram infectados pelo VFA e grupo controle. Conforme podemos observar na tabela 5, para o SNP rs11881222, 96,7% dos indivíduos infectados não foram vacinados contra Febre Amarela sendo que desses 57,4% carregam o genótipo AG ou GG variado. Para o SNP rs4803217, essa proporção permanece com 96,7% dos indivíduos infectados que não foram vacinados, sendo que 54,1% possuem o alelo variado G em homozigose ou heterozigose (CG ou GG).

As mesmas análises de infecção/grupo controle foram feitas para o SNP rs4803217 e a significância estatística se mantém tanto na análise univariada do genótipo ( $p=2,3E-04$ ; OR=1,997; IC=1,383 - 2,883), como na análise multivariada incluindo o sexo como uma co-variável ( $p= 2,2E-04$ ; OR=0,222; IC= 0,100 - 0,492) também demonstrada na Tabela 4. Entretanto, após a incluir variável “vacinação” nas análises uni e multivariada para esse SNP, não encontramos significância estatística (Tabela 5).

**Tabela 5:** Frequências genotípicas entre vacinados e não vacinados (estratificados por infectados e não infectados)

Polimorfismo	Genótipo	Vacinação			
		Não vacinados (n / %)		Vacinados (n / %)	
		Não infectados	Infectados	Não infectados	Infectados
rs11881222	A/A	1 (1,6)	24 (39,3)	9 (12,8)	21 (30)
	A/G ou G/G	1 (1,6)	35 (57,4)	4 (5,7)	36 (51,4)
	<b>Total</b>	2 (3,3)	59 (96,7)	13 (18,6)	57 (81,4)
rs4803217	C/C	1 (1,6)	26 (42,6)	9 (12,8)	18 (25,7)
	C/G ou GG	1 (1,6)	33 (54,1)	4 (5,7)	39 (55,7)
	<b>Total</b>	2 (3,3)	59 (96,7)	13 (18,6)	57 (81,4)

Independentemente do SNP tratado, realizamos uma análise dos possíveis desfechos resultantes da doença (óbito e sobrevivência) com relação à vacinação. Dos óbitos decorrentes de FA, 48,4% dos indivíduos não foram vacinados, sendo que 72,5% dos sobreviventes foram vacinados (Tabela 6). Tal dado reforça a importância e eficácia da vacinação ( $p=1,0E-06$ ).

**Tabela 6:** Relação entre a Vacinação contra Febre Amarela e os possíveis desfechos da FA.

<b>GENE IFN-<math>\lambda</math></b>	<b>Vacinados</b>	<b>Não vacinados</b>	<b>Sem dados</b>
<b>Controles</b>	26,0%	4,0%	70%
<b>Óbitos de FA</b>	21,5%	48,4%	30,1%
<b>Sobreviventes de FA</b>	72,5%	27,5%	0%

Em paralelo, realizamos uma análise da faixa etária com o possível desfecho após infecção por FA. Os indivíduos foram divididos em quatro faixas etárias: 0-19; 20-39; 40-59 e 60+. Cada grupo foi comparado separadamente com os demais grupos e, observamos uma diferença estatística entre o grupo de 60+ e os demais ( $p=0,0107$ ;  $OR=0.2750$ ;  $IC = 0.1089 - 0.7481$ ) conforme mostrado na Tabela 7. Observamos que os idosos (60+), são mais protegidos quando comparados aos outros grupos ( $OR= 0,2750$ ).

Da mesma forma, analisamos a etnia da coorte estudada - subdividida em Brancos; Pretos; Pardos e Amarelos - com os possíveis desfechos da doença e foi possível observar uma diferença estatisticamente significativa quando comparamos o grupo de Pretos com os demais grupos ( $p=0,0005$ ;  $OR=18,84$ ;  $IC = 2,849 - 208,7$ ) e de Brancos com os demais grupos ( $p=0,0046$ ;  $OR=0,3159$ ;  $IC= 0,1480 - 0,6975$ ) conforme mostrado na Tabela 7. Observamos que os pretos, quando comparados aos outros grupos étnicos são mais susceptíveis a infecção ( $OR= 18,84$ ).



**Tabela 7:** Descrição estatística da faixa etária e etnia.

<b>Gene IFN-<math>\lambda</math></b>	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>
<b>0-19 anos vs Outros</b>	0,6695	1,760	0,3975 - 7,730
<b>20-39 anos vs Outros</b>	0,7145	1,195	0,6024 - 2,456
<b>40-59 anos vs Outros</b>	0,2199	1,614	0,8226 - 3,193
<b>60+ anos vs Outros</b>	0,0107	0,2750	0,1089 - 0,7481

	<b>p</b>	<b>OR</b>	<b>IC</b>
<b>Pretos vs Outros</b>	0,0005	18,84	2,849 - 208,7
<b>Pardos vs Outros</b>	0,6371	1,256	0,5275 - 3,020
<b>Branços vs Outros</b>	0,0046	0,3158	0,1480 - 0,6975
<b>Amarelos vs Outros</b>	0,2992	3,600	0,4069 - 52,65

## 5. Discussão

Após o último surto de Febre Amarela iniciado no Brasil em 2016 e de forma não sazonal (região sudeste) conforme citado por Rezende, et al (1), observamos que além da falta de recursos vacinais e da importância do monitoramento epidemiológico para a doença, a falta de estudos relacionados ao VFA e sua imunopatologia são precários dentro da literatura científica. Atualmente, encontramos dados epidemiológicos e sobre o funcionamento do sistema imune frente à vacinação conforme escrito por Monath, et al (2), mas não há estudos sobre os mecanismos e moléculas que cercam a infecção pela cepa selvagem da FA, enquanto existem descrições bem elucidadas escritas para os outros flavivírus, tal como HCV, HVB, Dengue e Zika vírus já publicadas (23,24,27). Conjuntamente, não existem estudos de polimorfismos genéticos para a FA (susceptibilidade ou resistência).

A falta na descrição de variantes em humanos que possam estar envolvidas no curso da doença é notável. Logo, a descrição de SNPs suscetíveis às complicações decorrentes da infecção viral podem auxiliar na identificação de casos leves e graves. Assim, norteando as decisões médicas e trazendo agilidade e prioridade no tratamento ao doente, além de acrescentar ao meio científico e epidemiológico constância nesse assunto. Enquanto baseamos nossas informações apenas em um estudo publicado por Cong, et al em 2016 em um modelo animal (22) - única caracterização genética publicada para a Febre Amarela percebemos uma grande lacuna no conhecimento quanto a descrição dessas variações e alterações imunológicas antivirais. Tal lacuna de certa forma impossibilita que façamos discussões comparativas dos resultados obtidos nesse trabalho com a literatura.

A atividade antiviral promissora do IFN- $\lambda$  foi visada nesse trabalho levando em conta sua importância descrita em diversos estudos de ensaios clínicos para o vírus da hepatite C, vírus da hepatite B, vírus influenza, rinovírus, RSV, LCMV, rotavírus, norovírus e WNV (11,23,24,27,44,49). Tal como em trabalhos com Coronavírus que, mesmo não sendo um flavivírus, já se é sabido da participação do IFN- $\lambda$  no curso e evolução da doença (50,51).

Polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) em genes do IFN- $\lambda$ , têm sido amplamente investigados no contexto das infecções virais. Os SNPs escolhidos

(rs11881222 e rs4803217) foram aqueles com maior associação antiviral associados às doenças decorrentes dos flavivirus e no tratamento de doenças como; HCV, HBV, Dengue e Zika vírus (11,23,24,27,52).

O SNP rs4803217 é uma variante funcional do IFN- $\lambda$  é, que se encontra na região reguladora 3' não traduzida. Yi-Fan Lu, et al, demonstrou em 2015 que a presença do alelo G se correlaciona com a eliminação do HCV enquanto, o alelo C desfavorável, se correlaciona com a persistência da doença (53). Já o SNP rs11881222 é uma variante intrônica com significância clínica à drogas responsivas no tratamento de doenças decorrentes de flavivírus e na susceptibilidade e clearance viral no HCV (54).

Ao discutir os resultados iniciais de ambos os SNPs estudados, observamos que o alelo de menor frequência que, por consequência, é o alelo variado "G" está relacionado ao risco de infecção pelo VFA, ou seja, o indivíduo que carrega o alelo G variado é mais suscetível a essa infecção viral. A discussão anteriormente levantada se mantém mesmo após a inclusão do sexo nas análises, como uma covariante para o SNP rs11881222, revelando que o fato de ser do sexo masculino aumenta a chance de infecção na razão de 1/0,222, ou seja, 4,5 vezes maior as chances de ser infectado pelo VFA ao ser homem. Tal fato corrobora com os diversos achados sobre a susceptibilidade masculina frente às infecções virais, sejam estes fatores genéticos, hormonais ou até mesmo culturais que, como no caso da FA, os homens possuem uma maior exposição aos vetores ao adentrar e desbravar as matas por questões de trabalho (55-58).

Quando analisamos os resultados dos indivíduos vacinados em paralelo com a infecção ou não pelo VFA (coorte de interesse vs grupo controle) observamos que para o rs11881222, 96,7% dos indivíduos infectados não foram vacinados contra a cepa vacinal sendo que desses 57,4% possuem o genótipo AG ou GG - alelo G variante. Para o rs4803217, essa proporção permanece com 96,7% dos indivíduos infectados não vacinados, sendo que destes 54,1% possuem o alelo mutado G (CG ou GG). Um importante dado que podemos observar com esses dados é que mesmo após a vacinação a proteção integral para o vírus não ocorre já que pode ser infectado mesmo após vacinado (dados opostos ao informado pelo ministério da saúde em relação a cobertura vacinal) (4,6,8,59). Verificamos que para o rs11881222 - dos indivíduos vacinados - 81,4% foram infectados (51,4%

possuíam a variante alélica G) e para o rs4803217 - dos indivíduos vacinados - os mesmos 81,4% foram infectados (55,7% possuíam a variante alélica G). Tal dado reforça a importância da vacinação contra a Febre Amarela em toda população e não só as moradoras e/ou viajantes das áreas endêmicas já que ela traz resistência / proteção ao VFA mesmo que ao carregar o alelo variado G dos ambos SNPs estudados.

Em uma busca na literatura, encontramos estudos que avaliaram os mesmos SNPs em outras infecções virais decorrentes dos flavivírus - principalmente HCV e HVB. Eles observaram que a depuração viral estava associada com o alelo ancestral - A para o SNP rs11881222 e C para o SNP rs4803217. Também, uma certa resistência imunológica quanto ao genótipo GG (alelo variante G) corroborando com nossos achados (59-62). Entretanto, segundo María Guzmán-Fulgencio (2013) e Louise Nygaard Clausen (2010), diferente do que discutimos para o SNP rs11881222, o alelo A (ancestral) estaria envolvido na gravidade da doença hepática em paciente com HCV-GT3 do que em indivíduos que carregavam o alelo variado G favorável a depuração viral (63,64).

Desde 1985, Beeson citava a questão da idade avançada como um fator suscetível às infecções no geral (65). Atualmente, os dados levantados durante anos nesse meio descrevem que os idosos são os maiores alvos de infecções e doenças virais (66). Diferentemente da massa encontrada na literatura, nossos dados revelaram que os idosos (60+) quando comparados com as outras faixas etárias estudadas são mais resistentes à infecção por FA. Acreditamos que esse resultado reflete a não exposição desse grupo às matas ou aos locais de maior transmissão, além de, muitos idosos já estarem vacinados contra a doença. Paralelamente, quando analisamos os grupos étnicos, observamos que os pretos são mais suscetíveis a FA quando comparados aos outros grupos - dado que corrobora com os achados em HCV descritos por Rana Asali Hogarth em 2019 (67) e por Jaspreet Banga, et al em 2020 (68).

Várias limitações foram observadas em nosso estudo e precisam ser reconhecidas. Primeiro, sabemos que a casuística deste estudo foi e é um fator limitante já que em estudos de frequência de polimorfismos costumam apresentar um N amostral maior do que temos neste trabalho. Algumas estratégias de contato com outros grupos de pesquisa foram realizadas com o intuito de aumentar o N

amostral, porém não foi obtido sucesso visto que não estamos em surto para Febre Amarela nos últimos meses e o número de casos de Febre Amarela notificados não aumentou desde o último boletim epidemiológico (ou por diminuição de casos reais da doença, ou por falta de notificação compulsória).

Mesmo assim, percebemos que tais achados acrescentam dados com grande valia para um meio científico que é desfavorecido - se tratando de polimorfismos de nucleotídeo único em genes responsivos frente a infecção por Febre Amarela. Segundo a quantidade de DNA extraídos foi um impeditivo para que não prosseguíssemos com as análises dos 4 SNPs encontrados no TAG. A quantificação de DNA daria para a realização de apenas 2 dos SNPs que, nada obstante, geraram dados relevantes e que nunca foram descritos em Febre Amarela. Por último, a falta de dados clínicos mais robustos e a falta de informações de uma parte do nosso n amostral sobre a vacinação ou não contra FA dificultou que aprofundássemos mais nossas análises partindo de pressupostos clínicos fundamentais para a evolução e possíveis desfechos da doença mas que, ainda sim fizeram desse trabalho um pioneiro inédito nesse âmbito de estudo. A descrição de SNPs suscetíveis às complicações decorrentes da infecção viral irão auxiliar na identificação dos casos leves e graves da doença, norteando assim as decisões médicas e trazendo prioridade e agilidade ao tratamento do doente.

## 6. Conclusão

- Em ambos os SNPs estudados, ao carregar o alelo variante G (homozigose ou heterozigose contendo o alelo G) as chances de infecção para Febre Amarela são estatisticamente maiores;
- Dentro do grupo de infectados, o sexo masculino é estatisticamente mais atingido dentro da nossa coorte;
- Indivíduos não vacinados possuem maiores chances de infecção para a Febre Amarela;
- Com relação aos possíveis desfechos da doença (óbito e sobrevivência), a vacinação continua como fator de resistência para a sobrevivência da coorte estudada;
- Os idosos (60+) são mais protegidos contra a Febre Amarela comparado com os outros grupos etários;
- Os etnicamente pretos são mais suscetíveis a infecção por Febre Amarela.

## 7. Referências

1. Rezende IM de, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FC de M, Adelino TÉR, et al. Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLOS Neglected Tropical Diseases*. 2018 Jun 4;12(6):e0006538.
2. Monath TP, Woodall JP, Gubler DJ, Yuill TM, Mackenzie JS, Martins RM, et al. Yellow fever vaccine supply: a possible solution. *The Lancet*. 2016 Apr;387(10028):1599–600.
3. Guihot A, Bricaire F, Li T, Bossi P. Syndrome respiratoire aigu sévère : une épidémie singulière de pneumonie virale. *La Presse Médicale*. 2004 Mar;33(5):344–51.
4. Monath TP. Yellow fever: an update. *The Lancet Infectious Diseases*. 2001 Aug;1(1):11–20.
5. Vasconcelos PF da C. Febre amarela. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. 2003 Apr;36(2):275–93.
6. Ministério da saúde. Febre Amarela - Guia para profissionais de saúde [Internet]. 2017. 72 p. Available at: [http://bvsm.sau.br/bvs/publicacoes/febre\\_amarela\\_guia\\_profissionais\\_sau.br/pdf](http://bvsm.sau.br/bvs/publicacoes/febre_amarela_guia_profissionais_sau.br/pdf)
7. Chippaux J-P, Chippaux A. Yellow fever in Africa and the Americas: a historical and epidemiological perspective. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*. 2018 Aug 25;24(1).
8. Secretaria Municipal da Saúde. Febre Amarela | Secretaria Municipal da Saúde | Prefeitura da Cidade de São Paulo [Internet]. 2018 [citado 27 de agosto de 2018]. Available at: [https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/sau/vigilancia\\_em\\_sau/index.php?p=243611](https://www.prefeitura.sp.gov.br/cidade/secretarias/sau/vigilancia_em_sau/index.php?p=243611).
9. Ministério da Saúde. Situação epidemiológica da Febre Amarela no monitoramento 2019/2020. *Bol Epidemiológico* [Internet]. 2020;51(1):19. Available at: [https://www.sau.br/images/pdf/2020/janeiro/15/Boletim-epidemiologico-SVS\\_01.pdf](https://www.sau.br/images/pdf/2020/janeiro/15/Boletim-epidemiologico-SVS_01.pdf)
10. Solomon T, Mallewa M. No Title. 1 de fevereiro de 2001 [citado 27 de agosto de 2018];42(2). Available at: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0163445301908023>
11. Centers for Disease Control and Prevention, National Center for Emerging and Zoonotic Infectious Diseases (NCEZID), Division of Vector-Borne Diseases (DVBD). Clinical and Laboratory Evaluation | Yellow Fever | CDC [Internet]. 2015 [citado 27 de agosto de 2018]. Available at: <https://www.cdc.gov/yellowfever/healthcareproviders/healthcareprovidersclinlabeval.html>
12. Colebunders R, Mariage JL, Coche JC, Pirenne B, Kempinaire S, Hantson P, et al. A Belgian traveler who acquired yellow fever in the Gambia. *Clin Infect Dis*. 2002;35(10):113–6.
13. Chen Z, Liu L, Lv Y, Zhang W, Li J, Zhang Y, et al. A fatal yellow fever virus infection in China: description and lessons. *Emerg Microbes Infect* [Internet]. 2016;5(7):e69. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/emi.2016.89>
14. Muñoz J, Vilella A, Domingo C, Nicolas JM, De Ory F, Corachan M, et al. Yellow fever-associated viscerotropic disease in Barcelona, Spain. *J Travel Med*. 2008;15(3):202–5.
15. Reusken CBEM, Knoester M, GeurtsvanKessel C, Koopmans M, Knapen DG, Bierman

WFW, et al. Urine as sample type for molecular diagnosis of natural yellow fever virus infections. *J Clin Microbiol.* 2017;55(11):3294–6.

16. Flores, Eduardo Furtado et al. Patogenia das infecções víricas - Interações dos vírus com as células e com os hospedeiros. *Virologia Veterinária: Virologia Geral e Doenças Víricas.* 2012

17. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Guedes F, Takakura CFH, et al. Revisiting the liver in human yellow fever: Virus-induced apoptosis in hepatocytes associated with TGF- $\beta$ , TNF- $\alpha$  and NK cells activity. *Virology.* 2006;345(1):22–30.

18. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol [Internet].* 2015;64:160–73. Available at: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcv.2014.08.030>

19. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Vasconcelos PFC, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(2):161–8.

20. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Takakura C, da Costa Vasconcelos PF, et al. Reconsideration of histopathology and ultrastructural aspects of the human liver in yellow fever. *Acta Trop.* maio de 2005;94(2):116–27.

21. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol.* setembro de 2013;23(5):305– 18.

22. Cong Y, McArthur MA, Cohen M, Jahrling PB, Janosko KB, Josleyn N, et al. Characterization of Yellow Fever Virus Infection of Human and Non-human Primate Antigen Presenting Cells and Their Interaction with CD4+ T Cells. Barrett ADT, organizador. *PLoS Negl Trop Dis.* maio de 2016;10(5):e0004709.

23. Egli A, Santer DM, O'shea D, Tyrrell L, Houghton M. The impact of the interferon lambda family on the innate and adaptive immune response to viral infections. 2014;3:51.

24. Boisvert M, Shoukry NH. Type III interferons in hepatitis C virus infection. *Front Immunol.* 2016;7(DEC):1–12.

25. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, Vasconcelos PFDC, et al. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res.* 2006;116(1– 2):91–7.

26. Douam F, Ploss A. Yellow Fever Virus: Knowledge Gaps Impeding the Fight Against an Old Foe. *Trends Microbiol.* 2018;26:913–28.

27. Zhou J, Lu L, Yuen MF, Lam TW, Chung CP, Lam CL, et al. Polymorphisms of type I interferon receptor 1 promoter and their effects on chronic hepatitis B virus infection. *J Hepatol.* 2007;46(2):198–205.

28. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Chazal M, Hafirassou ML, Dejarnac O, Zamborlini A, et al. Vaccine and wild-type strains of yellow fever virus engage distinct entry mechanisms and differentially stimulate antiviral immune responses. *MBio.* 2016;7(1):1–15.

29. Perng Y-C, Lenschow DJ. ISG15 in antiviral immunity and beyond. *Nat Rev Microbiol [Internet].* 2018 [citado 16 de agosto de 2018];16(7):423–39. Available at: <https://doi.org/10.1038/s41579-018-0020-5>

30. Fernandez-Garcia MD, Meertens L, Chazal M, Hafirassou ML, Dejarnac O, Zamborlini A, et al. Vaccine and wild-type strains of yellow fever virus engage distinct entry mechanisms



and differentially stimulate antiviral immune responses. *MBio*. 2016;7(1):1–15.

31. Lam LKM, Watson AM, Ryman KD, Klimstra WB. Gamma-interferon exerts a critical early restriction on replication and dissemination of yellow fever virus vaccine strain. *npj Vaccines* [Internet]. 2018;3(1):1–10. Available at: <http://dx.doi.org/10.1038/s41541-017-0039-z>

32. Syedbasha M, Egli A. Interferon Lambda: Modulating Immunity in Infectious Diseases. *Front Immunol*. fevereiro de 2017;8:119.

33. Hemann, E. A., Gale, M., Jr., & Savan, R. (2017). Interferon lambda genetics and biology in regulation of viral control. *Frontiers in Immunology*, 8. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01707>

34. Koltsida, O., Hausding, M., Stavropoulos, A., Koch, S., Tzelepis, G., Übel, C., Kotenko, S. V., Sideras, P., Lehr, H. A., Tepe, M., Klucher, K. M., Doyle, S. E., Neurath, M. F., Finotto, S., & Andreakos, E. (2011). IL-28A (IFN- $\lambda$ 2) modulates lung DC function to promote Th1 immune skewing and suppress allergic airway disease. *EMBO Molecular Medicine*, 3(6), 348–361. <https://doi.org/10.1002/emmm.201100142>

35. Egli, A., Santer, D. M., O’Shea, D., Barakat, K., Syedbasha, M., Vollmer, M., Baluch, A., Bhat, R., Groenendyk, J., Joyce, M. A., Lisboa, L. F., Thomas, B. S., Battagay, M., Khanna, N., Mueller, T., Tyrrell, D. L. J., Houghton, M., Humar, A., & Kumar, D. (2014). IL-28B is a Key Regulator of B- and T-Cell Vaccine Responses against Influenza. *PLoS Pathogens*, 10(12), e1004556. <https://doi.org/10.1371/journal.ppat.1004556>

36. Brenndörfer ED, Weiland M, Frelin L, Derk E, Ahlén G, Jiao J, et al. Anti-tumor necrosis factor  $\alpha$  treatment promotes apoptosis and prevents liver regeneration in a transgenic mouse model of chronic hepatitis C. *Hepatology*. 2010;

37. Kotenko S V, ¶1 §, Durbin JE. Contribution of type III interferons to antiviral immunity: location, location, location. *J Biol Chem* [Internet]. 2017 [citado 16 de agosto de 2018];(18):7295–303. Available at: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5418032/pdf/zbc7295.pdf>

38. Douam F, Albrecht ES, Hrebikova G, Sadimin E, Davidson C, Kotenko S V. Type III Interferon-Mediated Signaling Is Yellow Fever Virus Infection In Vivo. 2017;8(4):1– 22.

39. Douam F, Soto Albrecht YE, Hrebikova G, Sadimin E, Davidson C, Kotenko S V, et al. Type III Interferon-Mediated Signaling Is Critical for Controlling Live Attenuated Yellow Fever Virus Infection In Vivo. *mbio.asm.org* [Internet]. [citado 13 de novembro de 2018];8:819–36. Available at: <https://doi.org/10.1128/mBio.00819-17>.

40. Ostuni R, Hospital SR, Tamassia N, Xing J, Zanoni I, Granucci F, et al. Interferon (IFN)- $\lambda$  Takes the Helm: Immunomodulatory Roles of Type III IFNs. *Immunol* [Internet]. 2017 [citado 16 de agosto de 2018];8:1661. Available at: [www.frontiersin.org](http://www.frontiersin.org)

41. Green S, Rothman A. Immunopathological mechanisms in dengue and dengue hemorrhagic fever. *Current Opinion in Infectious Diseases*. 2006.

42. Khaiboullina SF, Rizvanov AA, Holbrook MR, St. Jeor S. Yellow fever virus strains Asibi and 17D-204 infect human umbilical cord endothelial cells and induce novel changes in gene expression. *Virology*. novembro de 2005;342(2):167–76.

43. Basu A, Chaturvedi UC. Vascular endothelium: The battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunology and Medical Microbiology*. 2008.

44. Mendoza, J. L., Schneider, W. M., Hoffmann, H.-H., Vercauteren, K., Jude, K. M., Xiong,

- A., Moraga, I., Horton, T. M., Glenn, J. S., de Jong, Y. P., Rice, C. M., & Garcia, K. C. (2017). The ifn- $\lambda$ -ifn- $\lambda$ 1-il-10r $\beta$  complex reveals structural features underlying type III IFN functional plasticity. *Immunity*, 46(3), 379–392. <https://doi.org/10.1016/j.immuni.2017.02.017>
45. Leaché AD, Oaks JR. The Utility of Single Nucleotide Polymorphism (SNP) Data in Phylogenetics. *Annu Rev Ecol Evol Syst*. 2017;48:69–84.
46. Kwok PY, Chen X. Detection of single nucleotide polymorphisms. *Curr Issues Mol Biol*. 2003;5(2):43–60.
47. Schrodri SJ, Garcia VE, Rowland C, Jones HB. Pairwise linkage disequilibrium under disease models. *Eur J Hum Genet [Internet]*. 2007;15:212–20. Available at: [www.nature.com/ejhg](http://www.nature.com/ejhg)
48. Gabriel SB, Schaffner SF, Nguyen H, Moore JM, Blumenstiel B, Higgins J, et al. The Structure of Haplotype Blocks in the Human Genome Published by : American Association for the Advancement of Science Linked references are available on JSTOR for this article : The Structure of Haploty Blocks in the Human Genome. *Science (80- )*. 2002;296(5576):2225–9.
49. Hoffmann, H.-H., Schneider, W. M., & Rice, C. M. (2015). Interferons and viruses: An evolutionary arms race of molecular interactions. *Trends in Immunology*, 36(3), 124–138. <https://doi.org/10.1016/j.it.2015.01.004>
50. Saponi-Cortes JMR, Rivas MD, Calle F, et al. IFNL4 genetic variant can predispose to COVID-19. *medRxiv*. 2021:2021.03.01.21252696. doi:10.1101/2021.03.01.21252696
51. Amodio E, Pipitone RM, S G, al e. SARS-CoV-2 viral load, IFN $\lambda$  polymorphisms and the course of COVID-19: an observational study SARS-CoV-2 viral load, IFN $\lambda$  polymorphisms and the course of COVID-19: an observational study *J Clin Med.*; 2020; 2020;9(10). . doi:<https://doi.org/10.3390/jcm9103315>
52. Manry, J., Laval, G., Patin, E., Fornarino, S., Itan, Y., Fumagalli, M., Sironi, M., Tichit, M., Bouchier, C., Casanova, J.-L., Barreiro, L. B., & Quintana-Murci, L. (2011). Evolutionary genetic dissection of human interferons. *Journal of Experimental Medicine*, 208(13), 2747–2759. <https://doi.org/10.1084/jem.20111680>
53. Lu, YF., Mauger, D., Goldstein, D. et al. IFNL3 mRNA structure is remodeled by a functional non-coding polymorphism associated with hepatitis C virus clearance. *Sci Rep* 5, 16037 (2015). <https://doi.org/10.1038/srep16037>
54. Jin G, Kang H, Chen X, Dai D. Evaluation of the relationship between IL28B, IL10RB and IL28RA single-nucleotide polymorphisms and susceptibility to hepatitis C virus in Chinese Han population. *Infect Genet Evol*. 2014 Jan;21:8-14. doi: 10.1016/j.meegid.2013.10.009. Epub 2013 Oct 19. PMID: 24144988.
55. Silva, M.V.R., de Castro, M.V., Passos-Bueno, M.R. et al. Men are the main COVID-19 transmitters: behavior or biology?. *Discov Ment Health* 2, 1 (2022). <https://doi.org/10.1007/s44192-022-00004-3>
56. Teixeira TA, Oliveira YC, Bernardes FS, Kallas EG, Duarte-Neto AN, Esteves SC, Drevet JR, Hallak J. Viral infections and implications for male reproductive health. *Asian J Androl* 2021;23:335-47
57. Takahashi T, Iwasaki A. Sex differences in immune responses. *Science*. 2021 Jan 22;371(6527):347-348. doi: 10.1126/science.abe7199. PMID: 33479140.
58. Ruggieri A, Anticoli S, D'Ambrosio A, Giordani L, Viora M. The influence of sex and

gender on immunity, infection and vaccination. *Ann Ist Super Sanita*. 2016 Apr-Jun;52(2):198-204. doi: 10.4415/ANN\_16\_02\_11. PMID: 27364394.

59. Wilder-Smith A. Yellow fever vaccination: estimating coverage. *Lancet Infect Dis*. 2017 Nov;17(11):1109-1111. doi: 10.1016/S1473-3099(17)30494-2. Epub 2017 Aug 16. PMID: 28822782.

60. arapito, R., Poustchi, H., Kwemou, M. *et al*. Polymorphisms in *EGFR* and *IL28B* are associated with spontaneous clearance in an HCV-infected iranian population. *Genes Immun* 16, 514–518 (2015). <https://doi.org/10.1038/gene.2015.38>

61. Derbala M, Rizk NM, Al-Kaabi S, John A, Sharma M, El-dweik N, Yakoob R, Pasic F, Almohanadi M, Alejji K, Abdelmola A, Butt M. The predictive value of IL28B rs12979860, rs11881222 and rs8099917 polymorphisms and IP-10 in the therapeutic response of Egyptian genotype 4 patients. *Virology*. 2013 Sep;444(1-2):292-300. doi: 10.1016/j.virol.2013.06.025. Epub 2013 Jul 16. PMID: 23866096.

62. Mangone, G., Serranti, D., Bartolini, E. *et al*. SNPs of the *IFNL* favour spontaneous clearance of HCV infection in children. *Pediatr Res* 91, 1516–1521 (2022). <https://doi.org/10.1038/s41390-021-01557-9>

63. Guzmán-Fulgencio M, Berenguer J, García-Álvarez M, Fernández-Rodríguez A, Jiménez-Sousa MA, Alvarez E, Micheloud D, López JC, Miralles P, Cosín J, Catalán P, Resino S. IL28B polymorphisms are associated with severity of liver disease in human immunodeficiency virus (HIV) patients coinfecting with hepatitis C virus. *J Infect*. 2013 Feb;66(2):170-8. doi: 10.1016/j.jinf.2012.10.025. Epub 2012 Oct 26. PMID: 23103287.

64. Clausen LN, Weis N, Astvad K, Schønning K, Fenger M, Krarup H, Bukh J, Benfield T. Interleukin-28B polymorphisms are associated with hepatitis C virus clearance and viral load in a HIV-1-infected cohort. *J Viral Hepat*. 2011 Apr;18(4):e66-74. doi: 10.1111/j.1365-2893.2010.01392.x. Epub 2010 Nov 12. PMID: 21070502.

65. Beeson PB. Alleged susceptibility of the elderly to infection. *Yale J Biol Med*. 1985 Mar-Apr;58(2):71-7. PMID: 4036177; PMCID: PMC2589900.

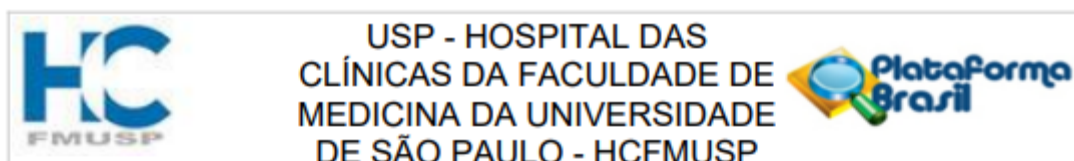
66. Lynch SM, Guo G, Gibson DS, Bjourson AJ, Rai TS. Role of Senescence and Aging in SARS-CoV-2 Infection and COVID-19 Disease. *Cells*. 2021 Nov 30;10(12):3367. doi: 10.3390/cells10123367. PMID: 34943875; PMCID: PMC8699414.

67. Hogarth RA. The Myth of Innate Racial Differences Between White and Black People's Bodies: Lessons From the 1793 Yellow Fever Epidemic in Philadelphia, Pennsylvania. *Am J Public Health*. 2019 Oct;109(10):1339-1341. doi: 10.2105/AJPH.2019.305245. Epub 2019 Aug 15. PMID: 31415198; PMCID: PMC6727282.

68. Banga J, Nizami S, Slim J, Nagarakanti S, Portilla M, Swaminathan S. Hepatitis C virus treatment response to ledipasvir/sofosbuvir among patients coinfecting with HIV and HCV: Real world data in a black population. *Medicine (Baltimore)*. 2020 Mar;99(11):e19140. doi: 10.1097/MD.00000000000019140. PMID: 32176039; PMCID: PMC7440318.

## 8. Anexos

### 8.1. Aprovação ética



#### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

##### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Febre Amarela: avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica antiviral e associação com suscetibilidade ou resistência à doença

**Pesquisador:** Jorge Kalil

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 29261620.9.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

##### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.944.812

##### Apresentação do Projeto:

Projeto Novo: Febre Amarela: avaliação de polimorfismos em genes envolvidos na resposta imunológica antiviral e associação com suscetibilidade ou resistência à doença

##### Objetivo da Pesquisa:

A hipótese deste estudo é que polimorfismos em genes da via de sinalização do interferon do tipo III e HLAs possam afetar o funcionamento e a instalação da resposta imunológica antiviral nos casos de Febre Amarela fatal. Portanto, o objetivo é identificar polimorfismos genéticos que possam afetar a resposta imunológica contra o vírus da Febre Amarela, conferindo maior susceptibilidade ou resistência à doença fatal em humanos

##### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este estudo será realizado com 76 amostras de DNA de uma coorte retrospectiva de indivíduos sintomáticos para Febre Amarela, cedidas pelo colaborador Dr. Esper Kallás. Dentre as 76 amostras, 27 são de indivíduos que vieram a óbito por febre amarela e 49 de sobreviventes. Desta forma o Estudo utilizara Banco de DNA e não haverá risco ao sujeito da Pesquisa. Os autores relatam sigilo dos indivíduos.

##### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Objetivo Primário:

Identificar se há polimorfismos genéticos que possam afetar a resposta imunológica contra o vírus

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 3.944.812

da Febre Amarela, conferindo maior  
susceptibilidade ou resistência à doença fatal em humanos.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Adequados. As amostras de DNA serão utilizadas do Estudo do Prof. George Kallás, Projeto aprovado em 2017 com o Título: Arboviroses no contexto da imunotivação crônica pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV).

**Recomendações:**

Aprovação

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Não há pendências, risco aos sujeitos da Pesquisa ou Inadequações

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

**Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:**

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1385151.pdf	19/02/2020 10:47:21		Aceito
Outros	ORCAMENTO.pdf	19/02/2020 10:47:09	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO.pdf	19/02/2020 10:46:32	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	parecer_dados_digitais.pdf	19/02/2020 10:46:20	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	CRONOGRAMA.docx	19/02/2020 10:45:50	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_pos.doc	19/02/2020 10:45:36	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	CARTA_JUSTIFICATIVA_AMOSTRAS.	19/02/2020	Elaine Lagonegro	Aceito

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br



USP - HOSPITAL DAS  
CLÍNICAS DA FACULDADE DE  
MEDICINA DA UNIVERSIDADE  
DE SÃO PAULO - HCFMUSP



Continuação do Parecer: 3.944.812

Outros	doc	10:45:25	Santana Martinho	Aceito
Outros	carta_dispenza_tcle.docx	19/02/2020 10:45:13	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	ARB_AprovacaoProjeto_E1_PN2132863 signed_1.pdf	19/02/2020 10:44:52	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	ANUENCIA_ASSINADA.pdf	19/02/2020 10:44:34	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Outros	FR_SGP_assinada.pdf	19/02/2020 10:44:07	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito
Folha de Rosto	FR_PB_ASSINADA.pdf	19/02/2020 10:43:54	Elaine Lagonegro Santana Martinho	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 31 de Março de 2020

---

**Assinado por:**  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar      **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP      **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585      **Fax:** (11)2661-7585      **E-mail:** cappesq.adm@hc.fm.usp.br

## 8.2. Dados brutos amostrais

ID	NOME	SEXO	IDADE	RAÇA	DIAS COM SIMTOMAS	CARGA VIRAL	DESFECHO CLÍNICO	DIAS ATÉ O ÓBITO	VACINA CONTRA FEBRE AMARELA	TIPO AMOSTRAL
ARB1002	Ricardo Pedro Pena	Masculino	42	Pardo	7	500	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1003	Marcelo Paulo Penteado	Masculino	47	Branco	5	5500	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1004	Amadeu Manuel da Silva	Masculino	36	Pardo	6	1800	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1006	Rodrigo Munhoz	Masculino	40	Branco	2	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1007	Claudio Luis de Oliveira	Masculino	46	Preto	5	7500	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1008	Francisco Antonio Rodrigues	Masculino	39	Branco	12	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1010	Luciano Aparecido Domingues	Masculino	47	Pardo	5	800	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1011	Esmeraldo Correia da Silva	Masculino	65	Branco	12	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1012	Marcio Nascimento Udala	Masculino	46	Pardo	9	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1014	Tony Dini	Masculino	39	Pardo	7	280	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1023	Codgi Augustus Suzuki	Masculino	44	Amarolo	5	200	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1024	Fábio Oliveira Sena	Masculino	39	Pardo	7	200	Óbito	11	Não vacinado	PBMC
ARB1026	Everton Gomes Marques	Masculino	25	Pardo	7	230	Óbito	17	Não vacinado	PBMC
ARB1027	Janildo Donizete Barbosa	Masculino	42	Branco	9	93	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1033	Manoel Alves Moreira	Masculino	40	Preto	12	10	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1034	Luis Antonio Stuani	Masculino	44	Branco	8	28	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1041	Deisy Vieira da Silva	Feminino	19	Branco	10	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1042	Henrique Ferreira de Santana	Masculino	25	Branco	6	18000	Óbito	14	Não vacinado	PBMC
ARB1043	Rodolfo Gouveia Lima	Masculino	34	Branco	7	310	Óbito	12	Não vacinado	PBMC
ARB1051	Maria Dolores Megano Alves	Feminino	68	Branco	8	300	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC

<b>ARB1052</b>	José Carlos Oliveira Silva	Masculino	55	Branco	8	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1053</b>	Andrea Pinho Bicalho	Feminino	42	Branco	8	230	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1054</b>	José Roberto Bezerra da Silva	Masculino	52	Pardo	9	150	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1055</b>	Ademir Francisco de Oliveira	Masculino	41	Branco	5	15000	Óbito	10	Vacinados	PBMC
<b>ARB1059</b>	Victor Jose da Rocha	Masculino	35	Branco	11	18	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1061</b>	Ruy Caetano Santos Neto	Masculino	34	Branco	5	4	Óbito	21	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1063</b>	Marcio Rosa Almeida	Masculino	44	Branco	6	480	Óbito	14	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1065</b>	Donizeti Rodrigues de Paula	Masculino	42	Branco	8	2900	Óbito	18	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1066</b>	Ulisses Aparecido de Almeida	Masculino	65	Branco	11	590	Óbito	17	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1069</b>	Adriano Rocha de Farias	Masculino	31	Branco	8	110	Óbito	9	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1070</b>	Willian da Silva Oliveira	Masculino	28	Pardo	6	60	Óbito	13	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1071</b>	Arthur da Silva Oliveira	Masculino	21	Branco	11	4	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1074</b>	Antonio das Graças Silva	Masculino	60	Branco	5	3000	Óbito	22	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1076</b>	Antonio Correia	Masculino	60	Branco	9	30	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1078</b>	João de Oliveira Silva	Masculino	66	Branco	6	390	Óbito	13	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1080</b>	João Ribeiro Albuquerque	Masculino	57	Branco	10	150	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1081</b>	José João dos Santos	Masculino	45	Branco	8	1700	Óbito	8	Vacinados	PBMC
<b>ARB1082</b>	Paulo Tavares da Silva	Masculino	63	Branco	10	10	Óbito	14	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1083</b>	João Oscar de Andrade Roschel	Masculino	72	Branco	12	2	Óbito	27	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1084</b>	Luan Barboza de Moraes	Masculino	19	Branco	9	7	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1085</b>	Gilberto Moraes dos Santos	Masculino	33	Branco	8	3	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1086</b>	Derisvaldo Rosa Marques	Masculino	36	Branco	4	110	Óbito	10	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1087</b>	Bruno Emanuel de Araujo Mendes	Masculino	27	Branco	10	21	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1088</b>	Francisco Adriano Oliveira Celestino	Masculino	27	Branco	8	13	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
<b>ARB1091</b>	Carlos Alberto Machado	Masculino	47	Pardo	10	1	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1095</b>	Everaldo Aguiar Costa	Masculino	43	Branco	12	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
<b>ARB1096</b>	João Atanagildo Tavares Neto	Masculino	26	Branco	3	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC



ARB1100	No data	Masculino	43	Preto	8	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1101	No data	Masculino	48	Sem Descrição	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1102	Valter Felizardo	Masculino	57	Preto	4	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1103	Vanderlei Pereira Pinto	Masculino	48	Branco	5	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	PBMC
ARB1104	João Maximiano de Almeida	Masculino	87	Branco	5	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	PBMC
ARB1105	Jean Tiago dos Santos Chagas	Masculino	50	Preto	9	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1106	Irineu Antonio Costa	Masculino	28	Preto	4	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1107	Antonio Gonçalves Leal	Masculino	49	Branco	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1108	Genilson dos Santos Barbosa	Masculino	44	Branco	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1109	Vanderli de Costa Mota	Masculino	25	Branco	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1110	Adriele Antunes de Moraes	Feminino	31	Branco	9	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1111	Maria Aparecida Silva	Feminino	63	Branco	6	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1112	Ilquias Alves da Rosa	Feminino	37	Amarolo	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1113	Samuel de Andrade Silva	Masculino	46	Branco	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1114	Elison Ribas Dias	Masculino	18	Branco	3	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1115	Bento Canuto de Jesus	Masculino	74	Preto	12	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1116	Antoniél Pércles Bezerra Lima	Masculino	25	Pardo	6	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1116	Jose Cordeiro de Cruz	Masculino	49	Branco	11	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1117	Valdecir Simão dos Santos	Masculino	48	Preto	9	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1118	Lucimara de Oliveira	Feminino	34	Branco	4	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1119	Leiton Santos da Silva	Masculino	27	Branco	9	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1120	Leandro Santos da Silva	Masculino	31	Pardo	8	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1121	Ugo Dorian Cocaul	Masculino	31	Preto	7	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Não vacinado	PBMC
ARB1122	Jose Antonio Terra Cezar	Masculino	57	Branco	9	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
ARB1123	Bruno Moreira Abbarado	Masculino	23	Branco	2	Sem Descrição	Sobrevivente	Não aplicável	Vacinados	PBMC
YFV01	Paulo Andrade Gois	Masculino	44	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Baço
YFV02	Rodolfo da Costa	Masculino	57	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Baço

YFV03	Luiz Carlos de Campos	Masculino	55	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV04	José Belarmino Benedito	Masculino	63	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV05	Tiago del Ciampo	Masculino	27	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV07	Mariana Nascimento Basaglia	Feminino	31	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV08	João Pinto Barbosa Filho	Masculino	64	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV09	Davi Evangelista cavenaghi	Masculino	37	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV10	Monika Oelkers	Feminino	76	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado
YFV11	Guilhermina Maria Cerpa	Feminino	74	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV12	Manoel Petronilio Paiva	Masculino	49	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Baço
YFV14	Jose de Lima Amaral	Masculino	73	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV15	Fabio Oliveira Sena	Masculino	39	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV16	Amancio Alves Pinto	Masculino	76	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV17	Laura Gomes da Silva	Feminino	72	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV18	Wellington Gonçalves Dias	Masculino	22	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV19	Antonio Aparecido de Freitas	Masculino	57	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV20	Salomão henrique de Souza	Masculino	51	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Baço
YFV21	Romeiro de Azevedo	Masculino	47	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado
YFV22	Marcelo Cordeiro de Silva Paiva	Masculino	36	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado
YFV23	Valentin Delponte junior	Masculino	56	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV24	Rodolfo Gouveia lima	Masculino	34	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV25	Arlindo marques Vicente da Costa	Masculino	54	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV27	José Augusto Alves de Santana	Masculino	63	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV29	Aurea da Silva Rodrigues	Feminino	48	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV30	Sidney Donizeti Pereira	Masculino	55	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Baço
YFV31	Everton Gomes marques	Masculino	25	Amarolo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV32	Jose Ferreira da Silva	Masculino	43	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Baço
YFV33	Antonio Aparecido leandro	Masculino	60	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado

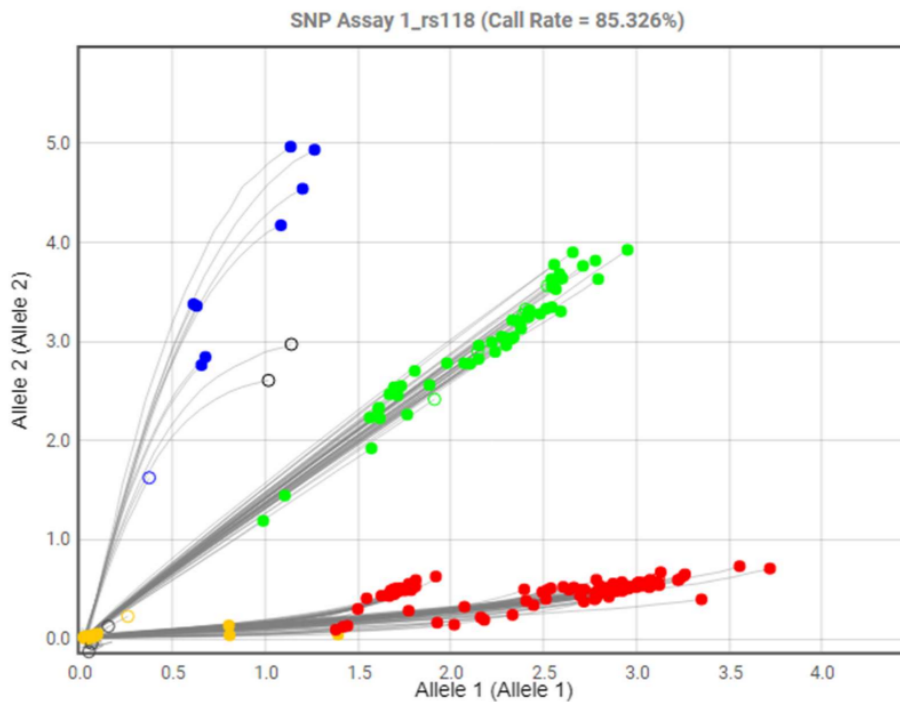
YFV34	Saulo Alberto de oliveira	Masculino	50	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV36	Franciane Alves Rodrigues	Feminino	27	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV37	Denis Hiroshi Matsumura	Masculino	19	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Baço
YFV38	Lauro Silva Vogel	Masculino	65	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Baço
YFV39	Henrique ferreira de Santana	Masculino	25	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV40	Sandra Regina Martos	Feminino	55	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV41	Waldimir Pereira dos Santos Jn.	Masculino	41	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV42	Isidoro Ramos	Masculino	86	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV43	Ademir francisco de oliveira	Masculino	41	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Baço
YFV44	Bruno Camargo da Silva	Masculino	16	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV45	Irineo de Oliveira	Masculino	47	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV46	Ana Barbosa de Oliveira	Feminino	74	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado
YFV47	Ulisses Aparecido de Almeida	Masculino	85	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV48	Marcio Rosa de Almeida	Masculino	44	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV49	Ruy Caetano dos Santos	Masculino	34	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV50	Angelo Barreto Mendes	Masculino	37	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Baço
YFV51	Fabiano Candido da Silva	Masculino	32	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Baço
YFV52	Donizeti Rodrigues de Paula	Masculino	42	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV53	Jose Carlos Nascimento da Silva	Masculino	31	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Baço
YFV54	Antonio Carlos da Silva	Masculino	51	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV55	Maria Noveas da Crus	Feminino	87	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV56	Josue Pereira Santos	Masculino	63	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV57	Lindinalva da Silva Delfino	Feminino	66	Preto	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Baço
YFV58	Renata Aparecida de Jesus	Feminino	24	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV60	Adriano Rocha de Farias	Masculino	31	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
YFV61	Anderson Antonio Nobrega	Masculino	33	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
YFV63	Juliana Chaves Correa	Feminino	33	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado

<b>YFV64</b>	Willian da Silva Oliveira	Masculino	28	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
<b>YFV65</b>	Milton Gomes da Silva	Masculino	47	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
<b>YFV66</b>	Maria Jose de Oliveira	Feminino	38	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado
<b>YFV68</b>	João de Oliveira Silva	Masculino	66	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
<b>YFV69</b>	Adão Baptista	Masculino	73	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Baço
<b>YFV70</b>	Francisco Dejaiedson Tavares	Masculino	54	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Baço
<b>YFV72</b>	Marino Dias	Masculino	41	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
<b>YFV73</b>	Amilton Wagner Rufino de Souza	Masculino	41	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
<b>YFV74</b>	Moacir Cardoso de Oliveira	Masculino	53	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
<b>YFV75</b>	Paulo Tavares da Silva	Masculino	63	Pardo	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
<b>YFV76</b>	João Galdencio da Silva	Masculino	54	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Baço
<b>YFV77</b>	Antônio das Graças Silva	Masculino	50	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Vacinados	Fígado
<b>YFV78</b>	Derisvaldo Rosa Marques	Masculino	36	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
<b>YFV79</b>	Antônio de Oliveira	Masculino	40	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não informado	Fígado
<b>YFV80</b>	Santino Bueno	Masculino	56	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
<b>YFV81</b>	Michel de Andrade Silva	Masculino	19	Branco	Sem descrição	Sem Descrição	Óbito	Sem Descrição	Não vacinado	Fígado
<b>CS1</b>	Adriana Campos C. Rodrigues	Feminino	52	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS2</b>	Valdenice G. Matos	Feminino	45	Pardo	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS3</b>	Eduardo Gomes Moreira	Masculino	37	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não vacinado	Medula Óssea
<b>CS4</b>	Jonathan Lacerda Garcia	Masculino	24	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS5</b>	Hedmo Brandão da Silva	Masculino	43	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS6</b>	Adelia Maria Duarte	Feminino	77	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS7</b>	Aparecida Holanda Gama	Feminino	52	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS8</b>	Ana Clebia Rebouças Costa	Feminino	31	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS9</b>	Ana Maria Pereira Jesus	Feminino	36	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não vacinado	Medula Óssea
<b>CS10</b>	José Raimundo dos Santos	Masculino	40	Pardo	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS11</b>	Quitéria Maria da Silva	Feminino	48	Pardo	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea

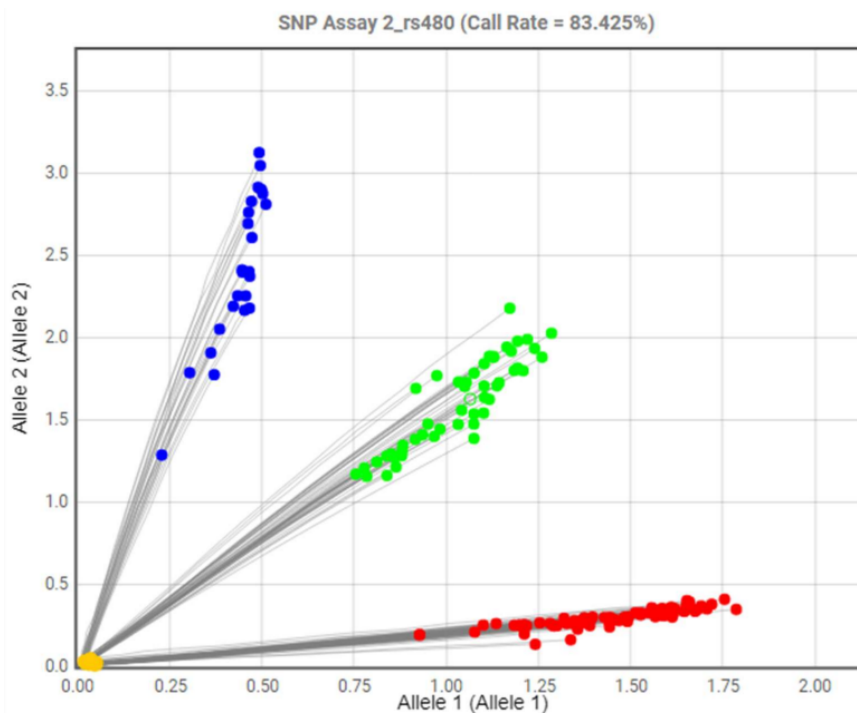
<b>CS12</b>	Maria Helena Babe Melo	Feminino	35	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS13</b>	Josefa Rodrigues de Araujo	Feminino	55	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS14</b>	Regiane Santos dos Reis	Feminino	47	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS15</b>	Eduardo Augusto Miotto	Masculino	50	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Vacinados	Medula Óssea
<b>CS16</b>	Illario Ferro Godoi	Masculino	19	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS17</b>	Bartolomeu Lacerda Chamusca	Masculino	22	Pardo	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS18</b>	Brianca Távora Faustino	Feminino	27	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS19</b>	Fatima Tavares Tabosa	Feminino	34	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS20</b>	Wesley Jordão Gouveia	Masculino	21	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS21</b>	no data	Masculino	no data	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS22</b>	Valdemar Rebimbas Domingues	Masculino	35	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS23</b>	Carmo Gravato Feitosa	Masculino	23	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS24</b>	José Paz Franca	Masculino	45	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS25</b>	Tierri Granjeiro Veiga	Masculino	27	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS26</b>	Amadeu Nogueira	Masculino	31	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS27</b>	Rodolfo Chousa Castanheira	Masculino	40	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS28</b>	Nelson Carmo Rebocho	Masculino	37	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS29</b>	Hélio Severiano Matias	Masculino	28	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS30</b>	Kauan Horta Quintal	Masculino	20	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS31</b>	Patrício Vilela Pereira	Masculino	21	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS32</b>	no data	Masculino	no data	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS33</b>	no data	Masculino	no data	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS34</b>	Dylan Cruz	Masculino	19	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS35</b>	Valentina Peixoto	Feminino	23	Pardo	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS36</b>	Dylan Souza Muniz	Masculino	34	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS37</b>	Josefina Simões de Oliveira	Feminino	33	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS38</b>	Armando Guedes Modesto	Masculino	41	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea

<b>CS39</b>	Rafael Santos Silva	Masculino	38	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS40</b>	Rayan Casqueira Valgueiro	Masculino	29	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS41</b>	Tobias Barreto Clementino	Masculino	20	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS42</b>	Vinícius Oliveira Lucas	Masculino	30	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS43</b>	José dos Santos Camargo	Masculino	31	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS44</b>	Alana Narvais Leite	Feminino	25	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS45</b>	Daniel Mena	Masculino	24	Preto	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS46</b>	no data	Feminino	no data	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS47</b>	Alcina Guerra Moura	Feminino	33	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS48</b>	Lena Colaço	Feminino	42	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS49</b>	Vinicius de Souza Bartolomeu	Masculino	37	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea
<b>CS50</b>	Samanta Vidigal	Feminino	29	Branco	Assintomático	Não aplicável	Controle	Não aplicável	Não informado	Medula Óssea

### 8.3. Genotipagem dos SNPs rs11881222 e rs4803217



**Figura 05 - Gráfico de discriminação alélica da genotipagem do SNP rs11881222.** Legenda: 194 amostras analisadas; Azul: Indivíduos homozigotos para o alelo variado (G - marcados com o fluoróforo FAM); Verde: Indivíduos heterozigotos marcados com os fluoróforos VIC e FAM); Vermelho: Indivíduos homozigotos para o alelo ancestral (T - marcados com o fluoróforo VIC). Os três grupos alélicos esperados eram: indivíduos homozigotos para o alelo A (herdado); indivíduos heterozigotos (um alelo herdado e um alelo variado); e indivíduos homozigotos para o alelo G (ambos alelos com a variação).



**Figura 06 - Gráfico de discriminação alélica da genotipagem do SNP rs4803217.** Legenda: 194 amostras analisadas; Azul: Indivíduos homozigotos para o alelo variado (G - marcados com o fluoróforo FAM); Verde:

Indivíduos heterozigotos marcados com os fluoróforos VIC e FAM); Vermelho: Indivíduos homozigotos para o alelo ancestral (C - marcados com o fluoróforo VIC). Os três grupos alélicos esperados eram: indivíduos homozigotos para o alelo C (herdado); indivíduos heterozigotos (um alelo herdado e um alelo variado); e indivíduos homozigotos para o alelo G (ambos alelos com a variação).

#### 8.4. Frequências alélicas mínimas (MAFs) completos

Gene	SNP	Genótipo	Frequência	Porcentagem	Total
IFN- $\lambda$	rs11881222	AA	99	51,03%	194 100%
		AG	92	47,42%	
		GG	3	1,55%	
	rs4803217	CC	93	47,94%	
		CG	87	44,85%	
		GG	14	7,22%	