

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA CASOS DE MICROCEFALIA

Doutoranda: Renata Valeria Nóbrega
Orientador: Enéas Ricardo de Moraes Gomes

João Pessoa
2021

RENATA VALERIA NÓBREGA

IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA CASOS DE MICROCEFALIA

Tese apresentada ao **Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia (RENORBIO)** do Centro de Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba, como requisito parcial para obtenção do título de **DOUTORA EM BIOTECNOLOGIA**, na área de concentração: **BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE**

Orientador: Enéas Ricardo de Moraes Gomes

**João Pessoa
2021**

Catálogo na publicação
Seção de Catalogação e Classificação

N7541 Nóbrega, Renata Valéria.

Identificação de biomarcadores para casos de microcefalia / Renata Valéria Nóbrega. - João Pessoa, 2021.

81f. : il.

Orientação: Enéas Ricardo de Moraes Gomes.
Tese (Doutorado) - UFPB/CBIOTEC.

1. Malformações - microcefalia. 2. Microcefalia. 3. Teste diagnóstico. 4. Biotecnologia. 5. Biomarcadores - identificação. I. Gomes, Enéas Ricardo de Moraes. II. Título.

UFPB/BC

CDU 616-007.24(043)

Elaborado por WALQUELINE DA SILVA ARAUJO - CRB-15/514



Biotecnologia



Coordenação Ponto Focal do Programa de Pós-Graduação em

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biotecnologia
Cidade Universitária, Campus I. CEP:58051-900. João Pessoa, PB.
Telefone : (83) 3216.7173 E-mails: securenorbio@cbiotec.ufpb.br
Homepage: <http://www.renorbio.org>.

Ata da Defesa de Tese de Doutorado da aluna do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia da Universidade Federal da Paraíba/RENORBIO RENATA VALÉRIA NÓBREGA candidata ao título de “Doutora” em Biotecnologia, Área de Concentração Biotecnologia em Saúde.

Aos vinte e sete dias do mês de agosto do ano de dois mil e vinte, às 14 horas, na Plataforma Google Meet, a Banca de Defesa de Tese presidida pelo Doutor Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Universidade Federal da Paraíba), e os membros titulares: Patrícia Mirella da Silva Scardua (Universidade Federal da Paraíba/RENORBIO), Aline Alves Lara Gomes (Faculdade Santa Emília de Rodat/ FASER), Samuel Paulo Cibulski (Universidade Federal da Paraíba), e Juliana Sousa Soares de Araújo (Universidade Federal da Paraíba) que perante a banca, a discente RENATA VALÉRIA NÓBREGA regularmente matriculada no Curso de Doutorado em Biotecnologia– RENORBIO, defendeu, para preenchimento do requisito do título de doutora, sua Tese intitulada “Identificação de biomarcadores para diagnóstico de microcefalia”. Após discorrer sobre o referido tema, a candidata foi argüida pelos examinadores na forma Regimental. Finalmente, a Banca reuniu-se em caráter secreto a proceder à avaliação e julgamento do trabalho concluindo por atribuir-lhe o conceito APROVADO. Em face de sua aprovação, achar-se a examinada legalmente habilitada a receber o Título de “DOUTORA” em Biotecnologia na Área de Saúde, cabendo a Universidade Federal da Paraíba, providências, como de direito, a expedição do Diploma que a mesma faz jus. Nada mais havendo a tratar, eu, Francis-Mary Nogueira de Lima, na qualidade de secretária, lavrei a presente Ata que submeto a aprovação da Comissão Examinadora.

Francis-Mary Nogueira de Lima (Secretária)

Prof. Dr. Enéas Ricardo de Moraes Gomes (Orientador)

Prof. Dr. Samuel Paulo Cibulski (Examinador Externo)

Profª. Drª. Patrícia Mirella da Silva Scardua. (Examinadora Interna)



Biocietologia



Coordenação Ponto Focal do Programa de Pós-Graduação em

Universidade Federal da Paraíba
Centro de Biocietologia
Cidade Universitária, Campus I, CEP:58051-900, João Pessoa, PB.
Telefone : (83) 3216.7173 E-mails: secrenorbio@cbiotec.ufpb.br
Homepage: <http://www.renorbio.org>

Juliana Sousa Soares de Araújo
Prof. Dr^a. Juliana Sousa Soares de Araújo (Examinadora Externa)

Aline Alves Lara Gomes
Prof. Dr^a. Aline Alves Lara Gomes (Examinadora Externa à Instituição)

Emitido em 27/08/2020

ATA Nº 1/2020 - RENORBIO (18.30.01)

(Nº do Documento: 1)

(Nº do Protocolo: NÃO PROTOCOLADO)

(Assinado digitalmente em 20/04/2021 16:19)

FRANCIS MARY NOGUEIRA DE LIMA

ASSISTENTE EM ADMINISTRACAO

335652

(Assinado digitalmente em 14/04/2021 07:40)

ENEAS RICARDO DE MORAIS GOMES

COORDENADOR DE CURSO

2008919

Para verificar a autenticidade deste documento entre em <https://sipac.ufpb.br/documentos/> informando seu número: 1, ano: 2020, documento (espécie): ATA, data de emissão: 14/04/2021 e o código de verificação: c66d300fla

À memória de:

José Marques da Nóbrega, Zé Maré, Painho...

Guardarei, sempre, as palavras de incentivo para não desistir dos desafios.

Dedico!

AGRADECIMENTOS

À Deus, “Fé não é só crer em Deus, é colocar n’Ele toda a nossa confiança”.
Padre Roger Araújo;

À minha família, mainha, irmãos e sobrinhos, pela força e compreensão nos momentos de ausência para dedicação aos novos aprendizados;

Ao Professor Drº Enéas Ricardo de Moraes Gomes, por acreditar e orientar esse trabalho com sabedoria e compreensão nos momentos de dificuldade. Obrigada pelo aprendizado nessa caminhada.

À minha amiga, Juliana Abath, companheira de luta na trajetória do doutorado. Atravessamos muitos desafios ao longo do curso, porém conseguimos vivenciar o mundo da multidisciplinaridade na biotecnologia. Persistência representa essa luta;

Aos colegas do trabalho, Secretaria de Estado da Saúde, Lacen e Facene, por entenderem a minha necessidade de tempo para a conclusão desse trabalho, permitindo trocas de agendas para cumprir as atividades acadêmicas;

Aos professores da banca, pelas contribuições realizadas durante a qualificação da banca, que culminaram por enriquecer a escrita desse trabalho;

Ao Professor Itácio pelo apoio na preparação técnica dos experimentos da pesquisa;

Ao professor João, especialista na área de biologia molecular, pela paciência no compartilhamento de seu conhecimento prático com a técnica de PCR;

Aos profissionais da Rede Cuidar, em especial Cláudio, Juliana e Cícera, pela dedicação no cuidado de crianças com malformação congênita no estado da Paraíba.

Aos familiares de João Pessoa que me apoiam nos momentos difíceis;

Às mães e crianças de microcefalia que autorizam a participação na pesquisa. Pensamos que talvez elas precisem apenas de ajuda financeira ou infraestrutura, mas raramente percebemos que há outras dificuldades envolvidas. Existe uma grande necessidade emocional e social.

“Deus permite a tempestade para provar a sua fé” Som do Monte – Frei José

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	Representação esquemática do fenótipo da microcefalia	14
FIGURA 2	Fluxograma indicando as palavras chaves adicionadas para seleção dos artigos científicos a serem analisados.	27
FIGURA 3	Diagrama com número de artigos relacionados às palavras-chaves selecionadas em busca prévia.	38
FIGURA 4	Expressão relativa de RNAm indicando aumento da expressão do gene SNCA em indivíduos microcefálicos.	44
FIGURA 5	Expressão relativa de RNAm, utilizando duas bandas, indicando aumento da expressão do gene SNCA em indivíduos microcefálicos.	45
FIGURA 6	Expressão relativa de RNAm indicando aumento da expressão do gene NRG em indivíduos microcefálicos.	47

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Quantificação do RNA extraído das amostras de crianças com Microcefalia e Controle	46
-----------------	--	----

LISTA DE QUADROS

QUADRO 1	Sequência dos primers para identificação dos marcadores para microcefalia utilizados nas reações de PCR.	40
QUADRO 2	Resultados para Diagnóstico de Zika dos pacientes em estudo	45
QUADRO 3	Primers validados para detecção dos marcadores moleculares	47
QUADRO 4	Padronização da reação de PCR para o gene da β -actina.	48
QUADRO 5	Padronização da reação de PCR para o gene SNCA.	49
QUADRO 6	Padronização da reação de PCR para o gene NRG.	53

RESUMO:

A microcefalia constitui em um achado clínico e pode decorrer de anomalias congênitas ou ter origem após o parto. As malformações congênitas, dentre elas a microcefalia, têm etiologia complexa e multifatorial, podendo ocorrer em decorrência de processos infecciosos durante a gestação. O aumento das notificações de microcefalia no Brasil desencadeou grandes dificuldades no diagnóstico específico e identificação dos agentes etiológicos da microcefalia. Sendo assim, torna-se evidente a necessidade de desenvolvimento de novas metodologias diagnósticas que facilitem e tornem mais barato o diagnóstico da microcefalia. Nesse sentido, o objetivo principal deste estudo foi identificar biomarcadores para casos de microcefalia. Para atender a esse objetivo, a população do estudo foi composta por crianças nascidas e atendidas nos serviços de saúde da rede pública no estado da Paraíba, a partir de 01 de agosto de 2015. A amostra foi composta por dois grupos, sendo um experimental, formado por crianças com microcefalia e um controle, composto por crianças cognitivamente saudáveis atendidas nos serviços de saúde da Rede Estadual da Paraíba. A pesquisa envolveu as seguintes etapas: 1- identificação de biomarcadores a partir de revisão integrativa; 2- validação dos biomarcadores em amostras de sangue; e 3- desenvolvimento do kit diagnóstico. Os dados foram apresentados no formato de média±erro padrão da média. As análises estatísticas dos resultados foram efetuadas por comparação das médias, para determinar as diferenças entre os grupos, bem como por testes de correlação, para determinar a inter-relação dos biomarcadores e a microcefalia. O projeto de pesquisa teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), parecer número 2.242.701, seguindo as normas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para a pesquisa envolvendo seres humanos (Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS. dispensável Ao final da revisão integrativa, foram identificados 2 genes com maior potencialidade para servirem de marcadores para a microcefalia, sendo eles: a alfa-sinucleína (SNCA) e neuregulina (NRG). Para a validação biológica, foram projetados alguns pares de primers para cada gene e após avaliação, identificou-se os pares de maior eficiência para cada gene. Posteriormente, foram realizadas as análises de PCR e verificou-se para ambos os genes ocorreu aumento da expressão no grupo de microcefálicos, demonstrando que esses genes podem ser utilizados como marcadores para microcefalia. Por fim ressaltamos que os marcadores identificados são fundamentais para produzir um kit diagnóstico para microcefalia disponibiliza uma ferramenta essencial para solucionar a grande dificuldade laboratorial de diagnóstico específico dos casos dessa síndrome. Além disso, o desenvolvimento desse kit resultou na obtenção de um recurso biotecnológico voltado para os avanços da saúde pública.

Palavras-chave: Microcefalia, Teste Diagnóstico, Biotecnologia, Biomarcadores.

ABSTRACT:

Microcephaly is a clinical finding and can result from congenital anomalies or originate after delivery. Congenital malformations, including microcephaly, have a complex and multifactorial etiology, which can occur as a result of infectious processes during pregnancy. The increase in microcephaly reports in Brazil triggered great difficulties in the specific diagnosis and identification of the etiological agents of microcephaly. Thus, it becomes evident the need to develop new diagnostic methodologies that facilitate and make the diagnosis of microcephaly cheaper. In this sense, the main objective of this study was to identify biomarkers for cases of microcephaly. To meet this objective, the study population consisted of children born and cared for in public health services in the state of Paraíba, as of August 1, 2015. The sample was composed of two groups, one being experimental, formed by children with microcephaly and a control, composed of cognitively healthy children cared for in the health services of the Paraíba State Network. The research involved the following steps: 1- identification of biomarkers from an integrative review; 2- validation of biomarkers in blood samples; and 3- development of the diagnostic kit. The data were presented in the format of mean \pm standard error of the mean. Statistical analyzes of the results were performed by comparing the means, to determine the differences between the groups, as well as by correlation tests, to determine the interrelationship of the biomarkers and microcephaly. The research project was approved by the Research Ethics Committee (CEP), opinion number 2,242,701, following the rules of the National Research Ethics Commission (CONEP) for research involving human beings (Resolution No. 466/12 of the National Council de Saúde / MS. dispensável At the end of the integrative review, 2 genes with the greatest potential to serve as markers for microcephaly were identified, namely: alpha-synuclein (SNCA) and neuregulin (NRG). some pairs of primers for each gene and after evaluation, the most efficient pairs were identified for each gene. Subsequently, PCR analyzes were performed and it was verified for both genes an increase in expression in the microcephalic group, demonstrating that these genes can be used as markers for microcephaly. Finally, we point out that the identified markers are essential to produce a diagnostic kit for microcephaly provides a f essential tool to solve the great laboratory difficulty of specific diagnosis of the cases of this syndrome. In addition, the development of this kit resulted in obtaining a biotechnological resource aimed at advances in public health.

Keywords: Microcephaly, Diagnostic Teste, Biotechnology, Biomarkers

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2. OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo Geral	19
2.2 Objetivos Específicos	19
3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA	20
3.1 Epidemiologia e Genética da Microcefalia	20
3.2 Biomarcadores de Doenças Neurodegenerativas	25
3.3 Inovação Tecnológica	27
4. METODOLOGIA	31
4.1 Revisão Integrativa	31
4.1.1 Identificação do tema e seleção da hipótese ou questão de pesquisa	32
4.1.2 Estabelecimento de revisão integrativa versus revisão sistemática de critérios para inclusão e exclusão de estudos/amostragem ou busca na literatura	32
4.1.3 Definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados/categorização dos estudos	33
4.1.4 Avaliação dos estudos incluídos	34
4.2 População e amostra do Estudo	34
4.3 Identificação e Coleta das amostras	36
4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão	36
4.3.2 Processo de consentimento	37
4.3.3 Coleta de sangue	38
4.3.4 Extração de RNA e síntese cDNA	38
4.4 Identificação de biomarcadores	41
4.5 Detecção dos biomarcadores	41
4.6 Análise de dados	31
4.7 Aspectos éticos	41
5. RESULTADOS E DISCUSSÃO	43
5.1 Revisão integrativa	43
5.2 Identificação de biomarcadores	45
5.3 Expressão do RNA dos genes NRG e SNCA	46
5.4 Processo de amplificação do gene da β -actina	47
5.5 Expressão do gene SNCA	47

5.6 Expressão do gene NRG	48
6 CONCLUSÃO	60
REFERÊNCIAS	61
APÊNDICE	64
APÊNDICE A – Declaração de Compromisso e Responsabilidade	65
APÊNDICE B - Declaração de Autorização Institucional para Uso de Banco de Dados	66
APÊNDICE C – Termo de Anuência	67
APÊNDICE D – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido	68
APÊNDICE E – Termo de Assentimento Livre e Esclarecido	72
ANEXO	76
ANEXO 01 - Questionário de investigação para Microcefalia / Ministério da Saúde	77

1. INTRODUÇÃO

A microcefalia é uma malformação congênita em que o cérebro não se desenvolve de maneira adequada: o perímetro cefálico dos recém-nascidos é menor que dois desvios-padrão da média para idade e sexo, podendo levar a alterações cerebrais e problemas no desenvolvimento neurológico. Além disso, considera-se que a criança com microcefalia, em alguns casos, pode apresentar alteração na estrutura do cérebro e problemas de desenvolvimento, bem como apresentam etiologia complexa e multifatorial, envolvendo fatores genéticos e ambientais (FAYE et al, 2014; VARGAS et al, 2016).

Em outubro de 2015 foi observado um aumento súbito na incidência de nascimentos de bebês com microcefalia, principalmente na região nordeste. A ocorrência foi comunicada ao Ministério da Saúde e, posteriormente, a Organização Mundial de Saúde (OMS). Estudos apontam que o aumento do número de casos de microcefalia no Brasil, principalmente no Nordeste do país, foi decorrente da infecção causada pelo ZIKV em gestantes. A rigor, estamos longe de poder estabelecer com certeza científica, respostas para várias questões pendentes, como qual é a real magnitude do aumento dos casos de microcefalia e mesmo se de fato a zika seria o agente causal do problema. (CAMARGO; KENNETH, 2016).

Nesse contexto, o Ministério da Saúde (2015c) publicou a portaria GM N° 1813, de 11 de novembro de 2015, que decretou a Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), por alteração no padrão de ocorrência de microcefalia. Trata-se de um agravo que o conhecimento da prevalência, a história clínica e o exame clínico e neurológico detalhados podem conduzir ao diagnóstico, porém, adicionalmente, os exames de neuroimagem disponíveis mostram que outras malformações do desenvolvimento cortical fetal também estão presentes. A dificuldade no diagnóstico de infecção relacionada ainda prejudica o entendimento da história natural da doença e da relação com a microcefalia (Nunes et al, 2016).

Diante do cenário da Emergência de Saúde Pública foi pertinente mencionar a complexidade do diagnóstico para apoiar a conduta terapêutica oportuna para os casos de Microcefalia. Ao tempo,

foi notório a necessidade de investimento na área de biotecnologia como estratégia de buscar alternativa de diagnóstico laboratorial para a microcefalia. De acordo com Capanema et al (2009), a biotecnologia reduz custos de diagnósticos ao proporcionar a realização de testes diversos com uma única amostra de sangue e permite o desenvolvimento dos chamados testes rápidos, de utilização simples e leitura fácil, substituindo com vantagens alguns testes convencionais.

Nesse sentido, tendo em vista o exposto da magnitude da emergência de saúde pública no Brasil e a grande dificuldade laboratorial para dar suporte ao diagnóstico específico dos casos de Microcefalia, esta tese, se justificou, ao propor a identificação de biomarcadores para casos de microcefalia, por apresentar uma possibilidade de desenvolver um teste de diagnóstico para microcefalia, otimizando o diagnóstico e intervenção nessas crianças e dando suporte as instâncias públicas para novas decisões no manejo desta nova realidade. Existem poucas ferramentas para diagnóstico específico da microcefalia, sendo estes baseados, atualmente, em exames de imagem, de um modo geral com altos custos associados, bem como a dependência de especialistas para realização dos exames.

Portanto, a identificação de biomarcadores para casos de microcefalia auxiliará no desenvolvimento de kit de diagnóstico de baixo custo quando comparado com os exames de imagem e possibilitará a descentralização da coleta de exames. A descentralização da coleta vencerá a grande dificuldade de deslocamento de crianças do interior do estado para realização de exames de imagem com especialista na capital. Além disso, a identificação de biomarcadores possibilitará nova tecnologia diagnóstica de microcefalia, representa uma forma de atração de capital para novos desenvolvimentos biotecnológicos e fomentando o desenvolvimento econômico.

Tratou-se de um estudo que buscou contribuir para a ampliação do conhecimento da microcefalia, problema de saúde pública, atrelado a diversos agentes etiológicos. Portanto, um impacto positivo para o desenvolvimento de tecnologia diagnóstica para microcefalia. Além disso, visa

divulgar amplamente na comunidade científica, contribuindo com o desenvolvimento de produtos biotecnológicos aplicados à saúde humana.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

Identificar biomarcadores para casos de microcefalia

2.2 Objetivos Específicos

1. Realizar uma revisão integrativa para mapeamento de biomarcadores associados à microcefalia;
2. Validar os biomarcadores com a aplicação da técnica de PCR;
3. Desenhar um protótipo de kit diagnóstico para microcefalia;

3. FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

Sabe-se que as malformações congênitas, dentre elas a microcefalia, têm etiologia complexa e multifatorial, podendo surgir em decorrência de processos infecciosos durante a gestação. A exemplo de outras infecções congênitas (citomegalovírus, rubéola e toxoplasmose) o desenvolvimento dessas anomalias depende de diferentes fatores, que podem estar relacionados à carga viral, fatores do hospedeiro, momento da infecção ou presença de outros fatores e condições desconhecidos até o momento (BRASIL, 2015b).

No tocante ao foco do estudo, esse capítulo abordará os aspectos de revisão da literatura relacionados a microcefalia, biomarcadores de doenças neurodegenerativas e tecnologias de diagnóstico.

3.1 Epidemiologia e aspectos gerais da Microcefalia e outras malformações congênitas

A prevalência de malformações congênitas é heterogênea e influenciada por fatores geográficos e socioculturais em todo o mundo. Segundo publicação recente, com base nos registros do Estudo Colaborativo Latino-Americano de Malformações Congênitas (ECLAMC) e considerando os nascidos em 129 maternidades da América do Sul, 25 (19,4%) destas no Brasil, entre 1995 e 2012, foram registrados 25.082 recém-nascidos com malformações em um total de 2.557.424 nascimentos (GILI, et al. 2016)

De acordo com Gili et al (2016) as malformações congênitas mais prevalentes (por 10.000 nascimentos) foram: polidactilia pós-axial (14,7/10.000), síndrome de Down (12,3/10.000), hidrocefalia (6,7/10.000), microtia (6,5/10.000), fissura labial com fissura do palato (6,2/10.000), espinha bífida (5,4/10.000) e anencefalia (4,7/10.000)

Segundo a OMS, informações sobre a prevalência de microcefalia congênita são limitadas. Em todo o mundo, os registros de defeitos congênitos apresentam taxas de microcefalia congênita variando de 0,5 por 10.000 nascimentos (0,005%) a 10-20 por 10.000 nascimentos (0,1-0,2%), considerando a definição de perímetro cefálico menor ou igual a -3 desvios-padrão para idade e sexo (microcefalia severa). Essas estimativas incluem natimortos e abortos, mas excluem os casos de microcefalia associada à anencefalia ou à encefalocele. Na Europa, a prevalência de microcefalia é estimada em 2,85 por 10.000 nascimentos (intervalo de confiança de 95%: 2,69 a 3,02 por 10.000 nascimentos) (BRASIL, 2017).

Segundo o ECLAMC, a prevalência de microcefalia congênita no Brasil é estimada em 1,98 por 10.000 nascimentos (intervalo de confiança de 95%: 1,48 a 2,27 por 10.000 nascimentos). Esta estimativa foi obtida a partir de uma correção das tendências seculares e sazonais existentes, bem como o efeito de hospitais com taxas extremas de prevalência. No entanto, sugere-se que essa taxa de 1,98 por 10.000 nascimentos pode estar subestimada para o Nordeste, onde a prevalência de microcefalia sempre foi maior que a de hospitais do resto do Brasil. De acordo com estudo publicado em 2000, a prevalência de microcefalia em recém-nascidos brasileiros era de 5,5 casos / 100.000 nascidos vivos e em 2010 foi de 5,7 casos / 100.000 nascidos vivos o SINASC (GRAF et al, 2010). Nesse período, é importante destacar que a notificação da doença não era obrigatória e não possuía critérios bem definidos.

A partir de 2015, devido ao aumento dos registros de microcefalia relacionados ao Zika vírus, o governo brasileiro exigiu que os relatos deste distúrbio tivessem notificação compulsória. (ARAÚJO et al., 2016). Dessa forma, entre as semanas epidemiológicas (SEs) 45/2015 e 52/2018 (08/11/2015 a 29/12/2018), o Ministério da Saúde (MS) notificou 17.041 casos suspeitos de alterações no crescimento e desenvolvimento possivelmente relacionados à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas, dos quais 2.133 (12,5%) foram excluídos, após criteriosa investigação, por não atenderem às definições de caso vigentes. Entre os casos de Recém nascidos e crianças confirmados,

exceto os óbitos, 1.739 (60,7%) estavam recebendo cuidados em puericultura, 1.000 (34,9%) em estimulação precoce e 1.828 (63,8%) no serviço de atenção especializada. A maioria dos casos notificados concentra-se na região Nordeste do país (58,5%), seguindo-se as regiões Sudeste (25,1%) e Centro-Oeste (7,5%). Os cinco estados com maior número de casos notificados são Pernambuco (16,4%), Bahia (15,6%), São Paulo (9,8%), Rio de Janeiro (6,9%) e Paraíba (6,9%) (BRASIL, 2019).

A microcefalia consiste em uma desordem associada com o desenvolvimento anormal do cérebro. Tal distúrbio neurodesenvolvimental é caracterizado por uma redução das circunferências cefálica ou occipito-frontal, sendo estas menores que 2 e 3 desvios-padrão (SD), respectivamente (Figura 1). Estas circunferências baseiam-se no volume cerebral intracraniano, posto que o crescimento desta estrutura depende da força de expansão do cérebro. Tais parâmetros costumam estar abaixo da média para sexo, idade e etnia (JORDÃO (2019) apud BARBELANNE; TSANG, 2014; ARAÚJO et al., 2016; MAHMOOD et al, 2011).



Figura 1: Representação esquemática do fenótipo da microcefalia. A) Bebê com diâmetro da cabeça normal. B) Bebê com microcefalia. C) Bebê com microcefalia grave (Adaptado de Centers for Disease Control and Prevention, 2016).

No Manual do Ministério da Saúde ficou estabelecido que o bebê com microcefalia apresenta um perímetro cefálico inferior a 2 desvios-padrão, ou seja, mais de 2 desvios-padrão abaixo da média para idade gestacional e sexo; já a microcefalia grave, o recém-nascido apresenta um perímetro cefálico inferior a 3 desvios-padrão, ou seja, mais de 3 desvios-padrão abaixo da média para idade

gestacional e sexo (BRASIL, 2019). A microcefalia pode ser acompanhada de epilepsia, paralisia cerebral, retardo no desenvolvimento cognitivo, motor e fala, além de problemas de visão e audição. Cerca de 90% das microcefalias estão associadas com retardo mental, exceto nas de origem familiar, que podem ter o desenvolvimento cognitivo normal. Tratamentos realizados desde os primeiros anos melhoram o desenvolvimento e a qualidade de vida da pessoa (BRASIL, 2020).

É importante mencionar que a microcefalia pode ser classificada de acordo com o período para o diagnóstico: microcefalia primária (congênita) quando se desenvolve antes das 32 semanas de gestação e secundária (pós-natal ou adquirida) se ocorrer posteriormente durante o desenvolvimento no primeiro ano de vida. Quando presente ao nascimento é denominada “microcefalia primária” (MCPH); por sua vez, quando desenvolvida após esta fase é chamada de “microcefalia secundária” (ABUELO, 2007). A MCPH está associada com fatores genéticos, e a secundária com influências ambientais.

Assim, é importante ressaltar que a maior parte dos neurônios são gerados a partir da 21ª semana de gestação, mas as conexões dendríticas e a mielinização só acontecem depois do nascimento. Logo, possivelmente, na MCPH ocorre uma diminuição na produção de neurônios e na microcefalia secundária, há uma menor atividade dos dendritos de neurônios normais (WOODS, 2004).

Ademais, a MCPH ocorre devido à uma diminuição do crescimento cerebral intrauterino; já a secundária é consequência de uma menor produção no período pós-natal, causado por atenuações da proliferação celular e/ou aumento da morte celular. Entretanto, mecanismos que interferem no desenvolvimento do cérebro no período pré-natal podem ocasionalmente serem insuficientes para resultar na microcefalia primária, resultando no crescimento reduzido do cérebro na fase pós-natal (microcefalia secundária) (VERLOES; DRUNAT; GRESSENS; PASSEMARD, 2009).

Apesar de existir uma classificação para o fenótipo da microcefalia, em geral, tanto a MCPH quanto a MC secundária, podem apresentar as características: malformações do sistema nervoso central; anatomia grosseiramente anormal do cérebro; manifestações isoladas (quando não associadas

com anomalias em outros órgãos) ou sindrômicas (relacionadas com alterações que ocorrem em outros locais do organismo) (VERLOES; DRUNAT; GRESSENS; PASSEMARD, 2009). Além disso, os mesmos autores sugerem que esta condição está relacionada com desordens do reparo do DNA (especialmente com instabilidade cromossômica); rearranjos genômicos (deleções ou duplicações que envolvem múltiplos genes, que podem resultar em variações do número de cópias gênicas associadas com a microcefalia e baixa estatura); e exposição a teratógenos. Por conta desta complexa etiologia, a MC está associada à várias condições humanas que influenciam o desenvolvimento do cérebro durante os períodos pré-natal, perinatal ou pós-natal precoce (O'DRISCOLL, JEGGO, 2008).

No que diz respeito ao acompanhamento do diagnóstico dos casos de microcefalia, o Ministério da Saúde (2016) destaca o diagnóstico inespecífico para complementar a investigação de estadiamento dos casos durante o curso da doença. Poderão ser identificadas alterações em diversos exames laboratoriais, tais como: discretas a moderadas leucopenia e trombocitopenia; e ligeira elevação da desidrogenase láctica sérica, gama glutamil transferase e de marcadores de atividade inflamatória (proteína C reativa, fibrinogênio e ferritina); e o diagnóstico laboratorial específico de vírus Zika.

Adicionalmente, também sabemos que, uma vez identificada a microcefalia por medidas antropométricas, sua confirmação depende de exames de imagem como ultrassonografia transfontanela ou tomografia computadorizada, o que muitas vezes limita ou retarda o diagnóstico conclusivo da microcefalia.

A história clínica materna e familiar, assim como intercorrências na gravidez e parto, são essenciais para o diagnóstico etiológico de microcefalia pré e pós-natal. É fundamental uma completa história clínica materna para detectar causas teratogênicas como hábitos alcoólicos e tabágicos, medicação (hidantoína), radiação, fenilcetonúria materna, diabetes, hipotireoidismo materno, mal nutrição e insuficiência placentária. As microcefalias estão relacionadas a fatores genéticos e cromossômicos, exposições ambientais da mãe no período pré-natal ou perinatal, destacando-se o consumo de álcool, drogas ilícitas ou medicamentos teratogênicos, contato com substâncias químicas

ou radiação ionizante, distúrbios metabólicos, e os processos infecciosos: toxoplasmose, rubéola, citomegalovírus, herpes e sífilis (VARGAS et al, 2016).

Considerando-se que a microcefalia apresenta uma etiologia extremamente complexa que envolve desde influências ambientais até mutações em genes específicos com funções relacionadas, em muitos casos, com a instabilidade genômica e com o sistema de reparo do DNA, o estudo da frequência de biomarcadores nos pacientes portadores dessa malformação se torna relevante a fim de que se possa contribuir na explanação de fatores de riscos associados com a microcefalia, principalmente devido à sua recente alta frequência no Nordeste brasileiro (ALVES, 2019).

Cabe destacar que até 2015, os patógenos mais frequentemente relacionados às infecções intrauterinas eram a bactéria *Treponema pallidum* que causa a sífilis (S), o protozoário que causa a toxoplasmose (TO) e os vírus da rubéola (R), citomegalovírus (C), vírus herpes simplex (H), compondo o acrônimo STORCH. A partir da epidemia de vírus Zika, foi observado a forte associação de malformações congênitas e condições neurológicas com a infecção pelo vírus Zika durante a gestação, levantando à necessidade do monitoramento integrado das malformações congênitas decorrentes de infecções durante a gestação e ampliando o acrônimo STORCH com adição do vírus Zika (Z) – STORCH+ZIKA (BRASIL, 2017).

3.2 Biomarcadores de Doenças Neurodegenerativas

O conhecimento de doenças neurodegenerativas tem sido circunscrito há muitos anos a seus aspectos clínicos e, em alguns casos, a diferentes tentativas terapêuticas. Há quase vinte anos, pouco se sabia sobre as causas dessas doenças e seus mecanismos de desenvolvimento. Os progressos realizados nos últimos anos têm sido muito positivos, e novos caminhos de investigação estão sendo abertos.

Hoje sabemos que as doenças neurodegenerativas são principalmente a consequência de anormalidades no processo de certas proteínas, o que ocasiona seu acúmulo nos neurônios ou nas

proximidades, diminuindo ou cancelando suas funções. A descoberta dessas proteínas permitiu seu uso como marcadores moleculares ou de imagem dessas doenças, como a beta-amilóide no caso da doença de Alzheimer. Portanto, o uso de biomarcadores no diagnóstico de doenças neurodegenerativas aumentou nos últimos anos.

Biomarcadores são eventos encontrados no corpo humano que são usados para identificar um estado biológico. Clinicamente, são muito úteis para determinar o risco, presença e gravidade de uma doença. O líquido cefalorraquidiano (LCR) é a fonte mais comum de biomarcadores moleculares na neurodegeneração. Por outro lado, a neuroimagem também fornece informações importantes sobre as áreas cerebrais afetadas. Entre esses biomarcadores, aqueles envolvidos com neuroimagem geralmente são caros e sua acessibilidade é frequentemente limitada. Os biomarcadores do LCR são sensíveis e específicos, mas seu uso é limitado porque é necessária uma punção lombar e, portanto, eles podem causar efeitos colaterais.

Dado o impacto da demência na população global, a comunidade científica se empenhou na busca de novos biomarcadores cuja disponibilidade é mais fácil para pacientes e médicos. Portanto, a opção foi procurar novos biomarcadores identificados no sangue. Além disso, devido ao preço mais baixo e à reduzida invasividade, um biomarcador periférico também pode oferecer a chance de servir como um teste de triagem para ajudar no diagnóstico da neurodegeneração e monitorar a progressão e resposta a um tratamento hipotético.

Muitas patologias neurais, incluindo a doença de Alzheimer, refletem-se em alterações nos perfis de expressão gênica, splicing e proteína no cérebro e no LCR, mas também no sangue, fornecendo um precedente para a pesquisa de biomarcadores nesse fluido corporal.

As tecnologias de *microarray* e de *high-throughput screening* para expressão gênica são ferramentas essenciais para identificar padrões diferenciais de expressão gênica, característicos da doença. No entanto, a interpretação dos padrões de expressão gênica pode ser difícil. A análise em

rede de dados de expressão gênica identificou genes causadores de doenças, biomarcadores de proteínas e vias biológicas associadas a doença de Alzheimer.

A esclerose lateral amiotrófica (ELA) é um distúrbio neurodegenerativo multi-sistêmico complexo, com diagnóstico atualmente limitado e sem opções terapêuticas. Apesar dos esforços intensos, ainda não foram estabelecidos biomarcadores clinicamente aplicáveis para ELA. É urgentemente necessário o desenvolvimento de biomarcadores que sejam úteis para o diagnóstico precoce e sejam seletivos para subgrupos de doenças, além de possuírem potencial prognóstico e indicadores de resposta ao tratamento. Além disso, os biomarcadores devem ser minimamente invasivos e facilmente acessíveis a partir de pacientes vivos. Assim, a maioria das pesquisas atuais concentra-se, em particular, na identificação de potenciais biomarcadores circulantes não invasivos baseados em RNA para diagnóstico e monitoramento mais rápidos e precisos da doença. Semelhante a ELA, a Microcefalia é uma doença neurodegenerativa complexa, que não apresenta biomarcadores estabelecidos para seu diagnóstico, havendo uma grande necessidade de desenvolvimento tecnológico nessa área.

3.3 Inovação tecnológica

No Brasil, a *Constituição Federal* estabelece, em seu artigo 200, que compete ao Sistema Único de Saúde (SUS) incrementar o desenvolvimento científico e tecnológico em sua área de atuação. Entretanto, alguns aspectos evidenciam a desarticulação entre o sistema de saúde e o sistema de inovação brasileiros no período recente: (a) inexistência de relações orgânicas entre a rede de prestação de serviços e as empresas do Complexo Industrial da Saúde (CIS); (b) política de saúde centrada na ampliação da oferta dos serviços, sem maiores considerações sobre a capacidade de inovação da indústria e, portanto, sobre o uso do poder de compra do Estado para uma política de desenvolvimento

das empresas e laboratórios nacionais; (c) política de ciência e tecnologia focada no sistema científico, desprezando articulações com uma política industrial de inovação e com as necessidades do sistema de saúde; e (d) inexistência de políticas regulatórias convergentes no campo da propriedade intelectual e da vigilância sanitária. (VIANA; SILVA; IBÁÑEZ; IOZZI, 2016).

Atualmente, o principal responsável pelo aumento dos custos dos sistemas nacionais de saúde é a incorporação de tecnologias, em particular aquelas relativas a produtos industriais (medicamentos, vacinas, equipamentos, órteses/próteses e testes diagnósticos). Essas tecnologias conformam um gigantesco segmento industrial altamente internacionalizado, oligopolizado e intensivo em pesquisa. Seu valor total ultrapassa um trilhão de dólares. Essas características conferem a ele um enorme poder de pressão política sobre os sistemas de saúde tendo, nas últimas décadas, gerado uma situação na qual, em muitos casos, as tecnologias passam mesmo a governar os sistemas de saúde. No que refere ao SUS, a despesa anual com a compra de produtos e tecnologias alcança hoje um patamar acima de R\$ 20 bilhões, sem levar em conta as despesas de estados e municípios.

De acordo com Guimarães et al (2019), no campo da pesquisa biomédica, um dos principais desafios atuais tem sido a dificuldade de decifrar a complexidade de enfermidades que cada vez mais se colocam como responsáveis por grande parte da carga de doenças em todo o mundo, inclusive entre nós - as doenças crônicas não-transmissíveis. Em paralelo, nossa política de pesquisa deve apontar para as enfermidades que atingem os segmentos mais vulneráveis de nossa população - as doenças incidentes em populações negligenciadas.

Ainda sobre a temática, o autor supracitado destaca que no terreno da epidemiologia, o desafio está no aperfeiçoamento de tecnologias capazes de garantir a qualidade das informações dessas bases de dados aos requisitos de investigação científica e também no controle ético-legal capaz de beneficiar a ciência sem colocar em risco os direitos individuais da cidadania. Finalmente, em uma agenda de pesquisa não poderá faltar o olhar para a investigação sobre o próprio metabolismo do SUS, sua gestão,

políticas, carências e sucessos, bem como sobre o desenvolvimento dos componentes não-públicos de serviços de saúde, ora em crise e habitualmente propenso a resolvê-la às custas das conquistas do SUS.

4. METODOLOGIA

4.1 Revisão Integrativa

A revisão integrativa de literatura é um método que tem como finalidade sintetizar resultados obtidos em pesquisas sobre um tema ou questão, de maneira sistemática, ordenada e abrangente. É denominada integrativa porque fornece informações mais amplas sobre um assunto/problema, constituindo, assim, um corpo de conhecimento. Deste modo, o revisor/pesquisador pode elaborar uma revisão integrativa com diferentes finalidades, podendo ser direcionada para a definição de conceitos, revisão de teorias ou análise metodológica dos estudos incluídos de um tópico particular (ERCOLE; MELO; ALCOFORADO, 2014).

De acordo com Mendes, Silveira e Galvão (2008), o método de revisão integrativa permite a inclusão simultânea de pesquisa quase-experimental e experimental, combinando dados de literatura teórica e empírica, proporcionando compreensão mais completa do tema de interesse. A variedade na composição da amostra da revisão integrativa em conjunção com a multiplicidade de finalidades desse método proporciona como resultado um quadro completo de conceitos complexos, de teorias ou problemas relativos ao cuidado na saúde (MENDES; SILVEIRA, GALVÃO, 2008).

Os autores supracitados, destacam que a construção da revisão integrativa precisa percorrer seis etapas distintas, sendo elas: a identificação do tema e seleção da hipótese ou questão de pesquisa; estabelecimento Revisão Integrativa versus Revisão Sistemática de critérios para inclusão e exclusão de estudos/amostragem ou busca na literatura; definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados/ categorização dos estudos; avaliação dos estudos incluídos; interpretação dos resultados; e apresentação da revisão/síntese do conhecimento.

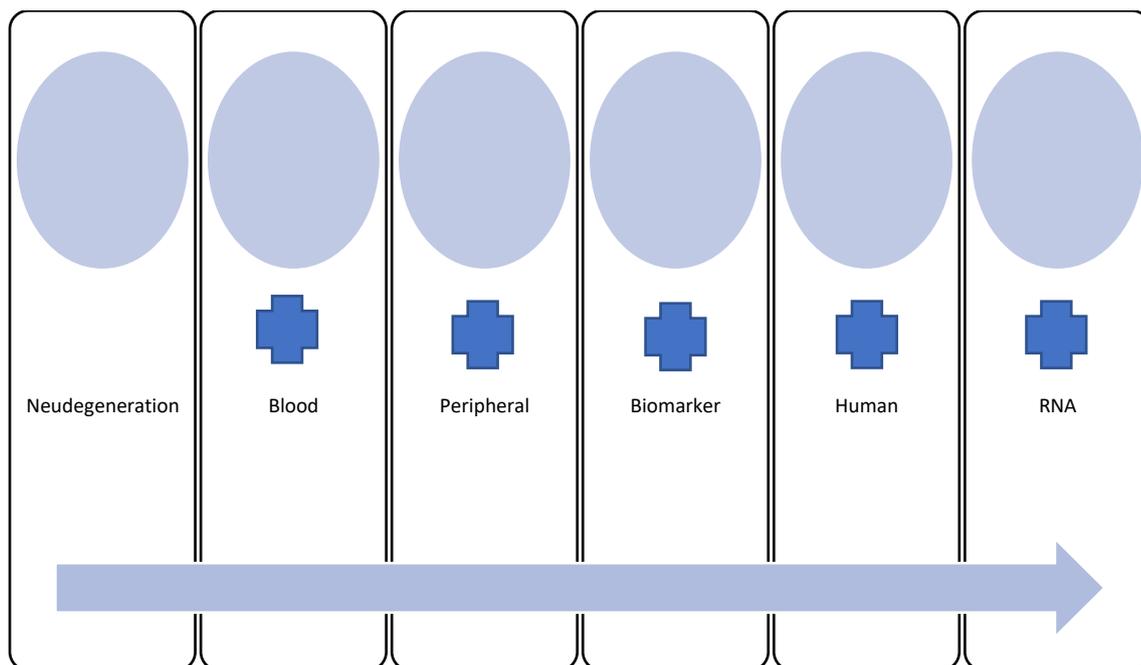
4.1.1 Identificação do tema e seleção da hipótese ou questão de pesquisa

O tema selecionado para a revisão foi definido a partir do objetivo específico “Identificar biomarcadores associados à microcefalia”. Por se tratar de uma temática pouco explorada nas bases de dados, definiu-se a fundamentação para identificar na literatura biomarcadores relacionados a alteração na estrutura do cérebro, considerando que a microcefalia é caracterizada pela medida do crânio realizada, por meio de técnica e equipamentos padronizados, em que o Perímetro Cefálico (PC) apresente medida menor que menos dois desvios-padrões abaixo da média específica para o sexo e idade gestacional. Para tanto, o tema foi definido a partir de palavras-chave: biomarcadores, neurodegeneração, microcefalia e sangue. A hipótese do estudo foi: Existem biomarcadores de doenças neurodegenerativas identificadas em crianças com microcefalia.

4.1.2 Estabelecimento de revisão integrativa versus revisão sistemática de critérios para inclusão e exclusão de estudos/amostragem ou busca na literatura

Esta etapa foi estruturada a partir dos atributos relacionados a hipótese do estudo, período de janeiro a março de 2019. Dessa forma, definiu-se a base de dados pubmed como primeira escolha de varredura na literatura, aplicados as palavras chaves: neurodegeneration, peripheral blood, biomarker human e RNA (Figura 2). Além disso, buscou-se estudos relacionados a temática na base de dados ISI Web of Science.

Figura 2: Fluxograma indicando as palavras chaves adicionadas para seleção dos artigos científicos a serem analisados.



Fonte: autor, 2020.

A partir da leitura dos resumos dos artigos, foi identificada uma relevância em dois biomarcadores com potencial relação com a microcefalia, considerando o destaque para associação a neurodegeneração em humanos e separados para leitura na íntegra dos estudos. Os marcadores Alpha-synuclein SNCA e Neuregulin tornaram-se o foco de refinamento da revisão.

4.1.3 Definição das informações a serem extraídas dos estudos selecionados/categorização dos estudos

A partir da identificação de dois biomarcadores com possibilidades de relação com a microcefalia foi estabelecido o agrupamento de todas as palavras-chave para consolidação da amostra, contemplando: gene, expressão do gene, sangue periférico, neurodegeneração e humano. Foram critérios de exclusão estudos de recursos textuais, artigos de jornal e textos não relacionados após leitura do resumo.

4.1.4 Avaliação dos estudos incluídos

Mediante ampla leitura de estudos sobre os biomarcadores, Alpha-synuclein SNCA e Neuregulin, a amostra (n= 04) ficou delimitada aos estudos descritos abaixo:

1 - Brown DJ, Lin B, Holguin B. Expression of neuregulin 1, a member of the epidermal growth factor family is expressed as multiple splice variants in the adult human cornea. *Invest Ophthalmol Vis Sci.* 2004 Sep;45(9):3021-9.

2 - Zhang HX, Zhao JP, Lv LX, Li WQ, Xu L, Ouyang X, Yuan ZQ, Huang JS. Explorative study on the expression of neuregulin-1 gene in peripheral blood of schizophrenia. *Neurosci Lett.* 2008 Jun 13;438(1):1-5.

3 - Araki K, Sugawara K, Hayakawa EH, Ubukawa K, Kobayashi I, Wakui H, Takahashi N, Sawada K, Mochizuki H, Nunomura W. The localization of α -synuclein in the process of differentiation of human erythroid cells. *Int J Hematol.* 2018 Aug;108(2):130-138.

4 - Watson MB, Richter F, Lee SK, Gabby L, Wu J, Masliah E, Effros RB, Chesselet MF. Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein. *Exp Neurol.* 2012 Oct;237(2):318-34.

4.2 População e amostra do Estudo

O presente estudo contemplou a população de crianças nascidas e atendidas nos serviços de saúde da rede pública no estado da Paraíba, a partir de 01 de agosto de 2015. A definição da data é justificada pelo período definido nos documentos do Ministério da Saúde para fazer uma busca retrospectiva de crianças com microcefalia, conforme publicação do primeiro protocolo do Ministério da Saúde divulgado em novembro de 2015 (Brasil, 2015a).

Dessa forma, a amostra foi composta de dois grupos, com mínimo de 10 crianças cada grupo. Grupo 01-experimental: composto por crianças com microcefalia confirmada; e Grupo 02-controle:

composto por crianças cognitivamente saudáveis atendidas nos serviços de saúde da Rede Estadual da Paraíba. Houve coleta de 01 controle para cada caso de microcefalia, totalizando vinte.

Entende-se por criança com microcefalia quando o perímetro cefálico estiver abaixo do terceiro percentil com base no sexo e idade gestacional, e cuja razão perímetro cefálico/comprimento (ambos medidos em centímetros) seja inferior a 0,65 (BRASIL, 2015b). Define-se como crianças cognitivamente saudáveis o bebê nascido vivo cujo perímetro cefálico fique acima do vigésimo quinto percentil com base no sexo e idade gestacional ou idade atual, na indisponibilidade de medidas corporais. Os casos de microcefalia e controles serão pareados com base na data de nascimento das crianças, 01/08/2015.

Os casos foram identificados com base nos registros notificados de microcefalia relatados pela Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba ao Ministério da Saúde a partir das informações do banco de dados de registros de microcefalia a fim de assegurar que as amostras seguiram os parâmetros exigidos da emergência de Saúde Pública existente até 2017.

4.3 Identificação e Coleta das amostras

A partir das listas de casos de crianças com microcefalia, foram mapeados os locais de acompanhamento destas crianças e elegível o Hospital Arlinda Marques, localizado no município de João Pessoa, para realizar a coleta. A definição ocorreu por se tratar de um serviço da Rede Cuidar, referência para o acompanhamento de crianças com Microcefalia.

Ao identificar as crianças contempladas na população da pesquisa, a equipe de campo organizou planejamento da coleta a partir da identificação dos turnos de atendimentos de crianças com microcefalia no Complexo Hospitalar Arlinda Marques. No dia de consulta, a equipe se apresentou a mãe e/ou responsável pela criança e fez uma breve descrição sobre a pesquisa. Durante a apresentação inicial, a equipe sinalizou que a participação é voluntária e mediante autorização foi realizada a entrevista para cumprimento dos critérios de inclusão da mãe e do bebê. Os casos aptos e que

aceitaram participar da pesquisa confirmaram a participação através da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), apêndice D

4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram elegíveis para o estudo, mães e bebês que apresentaram:

- 1) Residência no estado da Paraíba
- 2) Mãe maior de 12 anos de idade
- 3) Casos e controles atendam às respectivas definições de caso
- 4) A mãe, pai ou responsável do bebê que assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, conforme descrito na seção sobre consentimento.

Como critério de exclusão para o estudo, bebês e as mães que apresentaram algum dos itens listados abaixo não foram incluídos na pesquisa:

- 1) Mãe menor de 12 anos de idade
- 2) Desnutrição grave
- 3) Comprometimento ou suspeita de comprometimento da função imunológica, inclusive infecção pelo HIV, imunodeficiência primária, ingestão de corticosteróides orais ou injetáveis (ou equivalentes), ingestão de fármacos quimioterápicos ou imunomoduladores, entre outros.
- 4) Administração de imunoglobulina ou de outros produtos hemoderivados nos 60 dias anteriores ao recrutamento
- 5) Qualquer doença que, na opinião do investigador, possa constituir um risco de saúde para sua capacidade de participar da pesquisa e fornecer uma amostra de sangue.

4.3.2 Processo de consentimento

Para atender as normas preconizadas na Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/MS, que trata pesquisa envolvendo seres humanos, o consentimento para a participação da mãe e do bebê foi obtido das seguintes pessoas:

- Mãe que apresentou idade ≥ 18 anos ou for casada (independentemente da idade), foi permitido fornecer consentimento para si e para o bebê;
- Mãe solteira e tiver idade < 18 anos, o consentimento foi obtido de seus pais ou responsáveis legais. O consentimento para o bebê também foi obtido dos pais da mãe.

Após a coleta de informações, as crianças foram submetidas à coleta do sangue, por meio de técnica asséptica padrão para a coleta das amostras de sangue por punção venosa. Uma amostra de separador de soro será coletada da criança, até 3 mL. Foram necessários, no mínimo, 500 microlitros de sangue total para a realização da pesquisa.

4.3.3 Coleta de sangue

Foram coletados sangue (2 a 5 mL) com e sem anticoagulante de todos os grupos, permitindo tanto a separação de plasma como de soro para a utilização das análises de biomarcadores. As amostras foram transportadas em gelo, até o armazenamento no Laboratório de Biotecnologia Celular e Molecular do Centro de Biotecnologia da UFPB, em freezer -20°C .

4.3.4 Extração de RNA e síntese cDNA

O RNA total de amostra de sangue periférico foi extraído utilizando o reagente Trizol (Invitrogen) e o método desenvolvido por Chomczynski e Sacchi (1987), com modificações. No homogenato formado foi adicionado clorofórmio, esse complexo foi incubado por 5 minutos a 37°C e centrifugado por 15 minutos a 4°C e 16.100g. A fase superior foi coletada e o RNA foi precipitado com álcool isopropílico por 16 horas a -20°C . Uma nova centrifugação foi realizada e o precipitado de RNA foi então lavado com etanol 70% para posteriormente ser ressuscitado em água tratada com

DEPC (dietilpirocarbonato). O RNA foi quantificado por espectrofotometria nos comprimentos de ondas de 260 e 280 nm e armazenado a -80°C. A concentração do RNA foi estimada por absorvância ótica pela fórmula: $[RNA] \mu g/\mu l = (A_{260} \times 40/1000)$, onde f é o fator de diluição e 40 é o fator de conversão. Contaminantes de DNA foram removidos com adição de DNase I (Ambion Inc., Austin, TX) e a integridade do RNA total foi verificada através de um gel de agarose corado com 2 % de brometo de etídeo.

A alíquota de dois microgramas de RNA total foram utilizados como moldes para a síntese de cDNA na presença de 50 ng de iniciadores aleatórios (random primers), 200 U de M-MLV RT (RevertAid™ H Minus Moloney murine leukemia virus-reverse transcriptase, Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 200 U μl RNase Out (Fermentas Inc., Hanover, MD, USA), 0,5 mM de dNTPs, 2,5 mM de MgCl₂, 1 X de tampão da M-MLV RT em um volume final de 20 μl . O ciclo usado na reação foi de: 10 min a 20°C, 45 min a 42°C, 5 min a 95°C e 10 min a 4°C. Foi usado o termociclador PTC-100™, MJ Research, INC.

Como em um conjunto de amostras não foi possível obter concentração suficiente para utilizar 2 μg de RNA para síntese de cDNA, também realizou-se uma outra rodada de síntese de cDNA a partir de 1 μg de RNA. Os grupos de cDNA a partir de 2 μg ou 1 μg de RNA foram utilizados em experimentos independentes, não sendo utilizados para análise comparativa entre eles.

4.4 Identificação de biomarcadores

A partir dos genes identificados na revisão integrativa, foram desenhados alguns pares de primers para identificação dos genes alvos dos marcadores Neuregulin e alpha-synuclein. Baseado nos estudos de Brown e colaboradores, 2004 e Zhang et al., 2008 foram selecionados os primers para o gene que codifica o marcador Neuregulin. Já para a identificação do gene que codifica a alpha-synuclein, foram utilizados os estudos de Araki e colaboradores, 2018 e Watson e colaboradores, 2012

(Quadro 1). Para ambos os genes, foram desenhados primers para regiões diferentes do gene, aumentando a possibilidade de identificação mesmo com possíveis variantes do gene.

Quadro 1. Sequência dos primers para identificação dos marcadores para microcefalia utilizados nas reações de PCR.

Genes	Primers	Sequencia (5'->3')	Tamanho	Tm	GC%	Amplicon (pb)
Neuregulin – NRG	Nrg1-E2F_Brown ¹	CTTCGGTGTGAAACCAGTTC TGAATACTCCTC	32	66.69	46.88	485
	Nrg1-E2F_Brown	AACCAGTTCTGAATACTCCTC	21	54.67	42.86	
	Nrg1-E7R_Brown	AACTCATTGGGCACTTGCA CAAGTATCTCGA	32	68.25	43.75	343
	Nrg1-E7R_Brown	GCACTTGCACAAGTATCTCG A	21	58.664	47.62	
	NRG-Zhang-Fw ²	CTTTCTTGTTGCTGCATCTCC	21	57.79	47.62	
	NRG-Zhang-Rv	CACCCTTTTCAGGATGTGGT	20	57.71	50.00	
Alpha-synuclein – SNCA	SNCA-Fw_Araki ³	GAATTCTGGAAGATATGCCTG TGGATC	27	61.70	44.44	128
	SNCA-Rv_Araki	CAGCAGATCTCAAGAACTG GGAGC	25	63.59	52.00	
	SNCA-Fw_Watson ⁴	AAATGTTGGAGGAGCAGTGG	20	58.08	50.00	150
	SNCA-Rv_Watson	TCCAGAATTCCTTCCTGTGG	20	56.82	50.00	

Fonte: Autor, 2020

4.5 Detecção dos biomarcadores

Para a amplificação dos genes alvo, utilizou o seguinte protocolo de termociclagem:

- 1- 95°C por 5 minutos;
- 2- 95°C por 1 minuto;
- 3- 60°C por 45 segundos;
- 4- 72°C por 40 segundos;
- 5- 72°C por 10 minutos;

Os passos 2 a 4 foram repetidos 30 x antes de seguir para o passo 5. Após análises iniciais, o número de ciclos foi ajustado para 45, permitindo melhor identificação dos genes.

Após o processo de termociclagem, o produto da PCR foi corrido em gel de agarose a 0,7% e foram observados tanto a densidade das bandas quanto o peso molecular das bandas para confirmação da amplificação do produto desejado.

4.6 Análise de dados

Os dados foram analisados no formato de média \pm erro padrão da média. As análises estatísticas dos resultados foram efetuadas por teste t de Student, usados para comparação das médias e determinar a inter-relação dos biomarcadores e a microcefalia. Foram consideradas significativas diferenças com valores de p menores do que 0,05 ($p < 0,05$).

4.7 Aspectos éticos

O projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) seguindo as normas da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para a pesquisa envolvendo seres humanos - Resolução nº 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/ MS, resolução Nº 510, de 07 de abril de 2016, que dispõe sobre as normas aplicáveis a pesquisas em Ciências Humanas e Sociais cujos

procedimentos metodológicos envolvam a utilização de dados diretamente obtidos com os participantes ou de informações identificáveis ou que possam acarretar riscos maiores do que os existentes na vida cotidiana e a norma operacional 001/2016 que trata dos procedimentos para submissão, avaliação e acompanhamento da pesquisa e de desenvolvimento envolvendo seres humanos. Os responsáveis pelas crianças assinaram um Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE.

5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

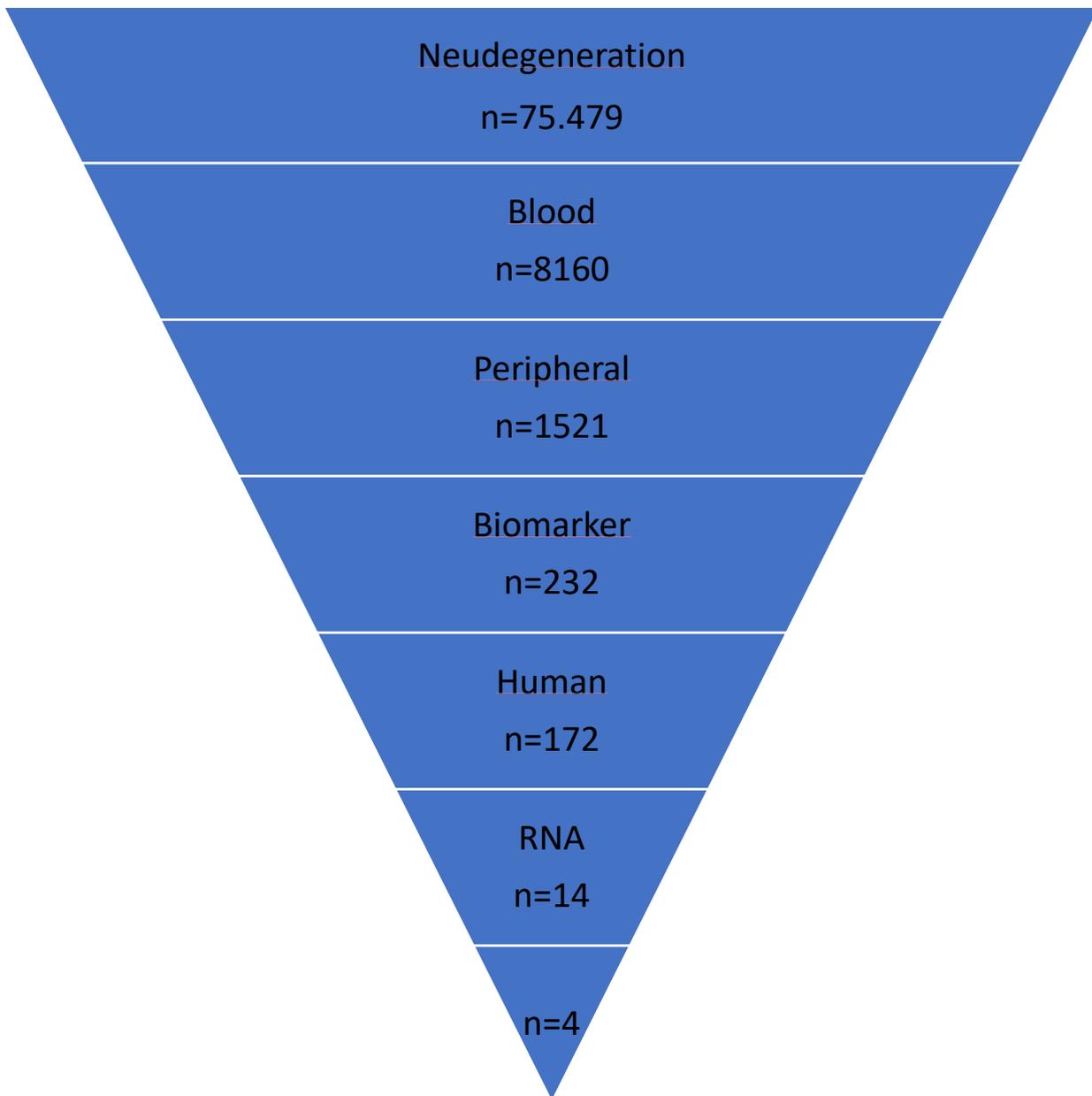
Os resultados apresentados a seguir estão divididos em dois grupos principais. O primeiro, resultado de uma revisão integrativa, baseada em triagem de literatura. A segunda, apresenta resultados experimentais, a partir de amostras biológicas de indivíduos microcefálicos e indivíduos controle.

5.1 Revisão integrativa

Inicialmente, apresentamos os resultados da revisão integrativa, indicando a quantidade de artigos científicos encontrados no processo de adição de palavras chave relacionadas a nossa busca, como ilustrado na figura 3.

Considerando que a nossa meta principal nesse projeto é desenvolver um sistema de diagnóstico para microcefalia utilizando sangue periférico, as palavras chave que foram utilizadas na busca foram adicionadas, fazendo o afinamento para termos os estudos mais correlacionados com a proposta da pesquisa.

Figura 3. Diagrama com número de artigos relacionados às palavras-chave selecionadas em busca na revisão integrativa



Fonte: Autor, 2020

Ao final da revisão integrativa, identificamos que os genes que codificam as proteínas Neuregulin e alpha-synuclein foram os mais consistentes para serem validados em amostras biológicas.

Para tanto prosseguimos para as próximas etapas alvejando esses genes como biomarcadores para a microcefalia.

5.2 Identificação de biomarcadores

Após a identificação dos genes candidatos a biomarcadores pela revisão integrativa, realizamos a coleta de sangue dos pacientes e extração do RNA que foi quantificado como apresentado na tabela 1.

Como o desenvolvimento da pesquisa ocorreu durante o período da emergência em saúde pública relacionado ao Zika vírus, tivemos incluídos pacientes com resultado laboratorial positivo para Zika, entretanto o critério para coleta das amostras foi a definição de criança com microcefalia, independente do diagnóstico de Zika. Conforme podemos observar na tabela abaixo tivemos 7 crianças positivas para Zika e 3 sem informação de resultado laboratorial.

Quadro 2. Resultados para Diagnóstico de Zika dos pacientes em estudo

CRIANÇAS	RESULTADO DE EXAME - ZIKA VÍRUS
Micro 1	POSITIVO
Micro 2	SEM INFORMAÇÃO DE RESULTADO LABORATORIAL
Micro 3	POSITIVO
Micro 4	POSITIVO
Micro 5	SEM INFORMAÇÃO DE RESULTADO LABORATORIAL
Micro 6	SEM INFORMAÇÃO DE RESULTADO LABORATORIAL
Micro 7	POSITIVO
Micro 8	POSITIVO
Micro 9	POSITIVO
Micro 10	POSITIVO

Tabela 1: Quantificação do RNA extraído das amostras de crianças com Microcefalia e Controle

Crianças com Microcefalia		Controle	
Número de identificação da amostra	Dosagem de RNA $\mu\text{g}/\mu\text{L}$	Número de identificação da amostra	Dosagem de RNA $\mu\text{g}/\mu\text{L}$
1.	0,0023 (2ª dosagem – 0,0687)	1	0,0041 (2ª dosagem – 0,0019)
2.	0,1214	2	0,0246
3.	0,2111	3	0,0098
4.	0,1448	4	0,0165
5.	0,0064 (2ª dosagem – 0,00485)	5	0,0908
6.	0,1004	6	0,0567
7.	0,3764	7	0,0380
8.	0,1619	8	0,0393
9.	0,2801	9	0,2015
10.	0,2440	10	0,0081

Considerando os valores encontrados na dosagem dos RNAs, decidimos seguir com a síntese da fita de cDNA de duas formas: 1- utilizando 2 μg de RNA como molde para a síntese da fita de cDNA, de acordo com o protocolo padrão utilizado em nosso laboratório, em consonância com as recomendações do fabricante do Kit de síntese de cDNA, resultando em uma quantidade menor de amostras podendo ser utilizadas nos experimentos; e 2- utilizando 1 μg de RNA como molde para a síntese da fita de cDNA, resultando em uma quantidade maior de amostras podendo ser utilizadas nos experimentos.

5.3 Expressão do RNA dos genes NRG e SNCA

Para a padronização inicial dos primers dos genes testados, utilizou-se o cDNA preparado com 2 μg de RNA. Após a padronização inicial, buscando aumentar o número de amostras testadas, ampliando a consistência dos dados analisados, realizamos as reações de PCR com os cDNAs preparados com 1 μg de RNA. Todas as reações foram normalizadas pela expressão do gene constitutivo β -actina.

A seguir apresentamos o protocolo final otimizado para cada gene, utilizando os cDNAs preparados com 1 µg de RNA.

Para a validação das análises foram selecionados os primers abaixo identificados por terem demonstrado características melhores para a PCR.

Quadro 3 – Primers validados para detecção dos marcadores moleculares

Genes	Primers	Sequencia (5'->3')	Tamanho	Tm	GC%	Amplicon (pb)
Neuregulin - NRG	NRG-Zhang-Fw ²	CTTTCTTGTTGCTGCATCTCC	21	57.79	47.62	343
	NRG-Zhang-Rv	CACCCTTTTCAGGATGTGGT	20	57.71	50.00	
Alpha-synuclein - SNCA	SNCA-Fw_Watson ⁴	AAATGTTGGAGGAGCAGTGG	20	58.08	50.00	150
	SNCA-Rv_Watson	TCCAGAATTCCTTCCTGTGG	20	56.82	50.00	

5.4 Processo de amplificação do gene da β-actina

A amplificação seguiu o seguinte protocolo para a β-actina: 45 ciclos de 1 minutos de desnaturação a 95 °C, 45 segundos de anelamento a 60 °C e 40 segundos de extensão a 72 °C (**Quadro 4**).

Para a amplificação da β-actina, para o volume final da reação de 20 µL, foram usados 10 µL de Master mix, 0,8 µL de primer Fw e 0,8 µL de primer Rv, 7,4 µL de água e 1 µL de cDNA (**Quadro 4**).

Quadro 4: Padronização da reação de PCR para o gene da β -actina.

Amostra	cDNA	Primer	Reação 1x
14	CT 5	B-Actina	- Master Mix → 10 uL
15	CT 6	B-Actina	- Primer Fw → 0,8 uL
16	CT 7	B-Actina	- Primer Rv → 0,8 uL
17	CT 8	B-Actina	- Água → 7,4 uL
18	CT 9	B-Actina	- cDNA → 1 uL Volume total = 20 uL
19	MIC 2	B-Actina	Termociclagem:
20	MIC 3	B-Actina	95°C por 5min
21	MIC 4	B-Actina	95°C por 1 min
22	MIC 6	B-Actina	60°C por 45 seg. } 45x
23	MIC 7	B-Actina	72°C por 40 seg. }
			72° por 10 min.

Fonte: Autor, 2020

5.5 Expressão do gene SNCA

A amplificação seguiu o seguinte protocolo para o SNCA: 45 ciclos de 1 minutos de desnaturação a 95 °C, 45 segundos de anelamento a 60 °C e 40 segundos de extensão a 72 °C (**Quadro 5**).

Para a amplificação do gene SNCA, para o volume final da reação de 20 μ L, foram usados 10 μ L de Master mix, 0,8 μ L de primer Fw e 0,8 μ L de primer Rv, 7,4 μ L de água e 1 μ L de cDNA, para o gene SNCA (**Quadro 5**).

Em um microtubo de 0,2 mL, considerando o volume final da reação de 20 μ L, foram usados 0,8 μ L do primer, 7,4 μ L de água e 1 μ L de cDNA, para o gene SNCA (**Quadro 5**).

Quadro 5: Padronização da reação de PCR para o gene SNCA.

Amostra	cDNA	Primer	Reação 1x
1	CT 5	SNCA Watson	- Master Mix → 10 uL - Primer Fw → 0,8 uL - Primer Rv → 0,8 uL - Água → 7,4 uL - cDNA → 1 uL Volume total = 20 uL
2	CT 6	SNCA Watson	
3	CT 7	SNCA Watson	
4	CT 8	SNCA Watson	
5	CT 9	SNCA Watson	
6	MIC 2	SNCA Watson	Termociclagem: 95°C por 5min 95°C por 1 min 60°C por 45 seg. } 45x 72°C por 40 seg. 72° por 10 min.
7	MIC 3	SNCA Watson	
8	MIC 4	SNCA Watson	
9	MIC 6	SNCA Watson	
10	MIC 7	SNCA Watson	
11	MIC 8	SNCA Watson	
12	MIC 9	SNCA Watson	
13	MIC 10	SNCA Watson	

Fonte: Autor, 2020

Após a amplificação das amostras pela PCR, realizamos a corrida dos produtos em gel de agarose, e observamos aumento significativo da expressão do gene SNCA em indivíduos microcefálicos em relação aos indivíduos controle, como observado na Figura 4.

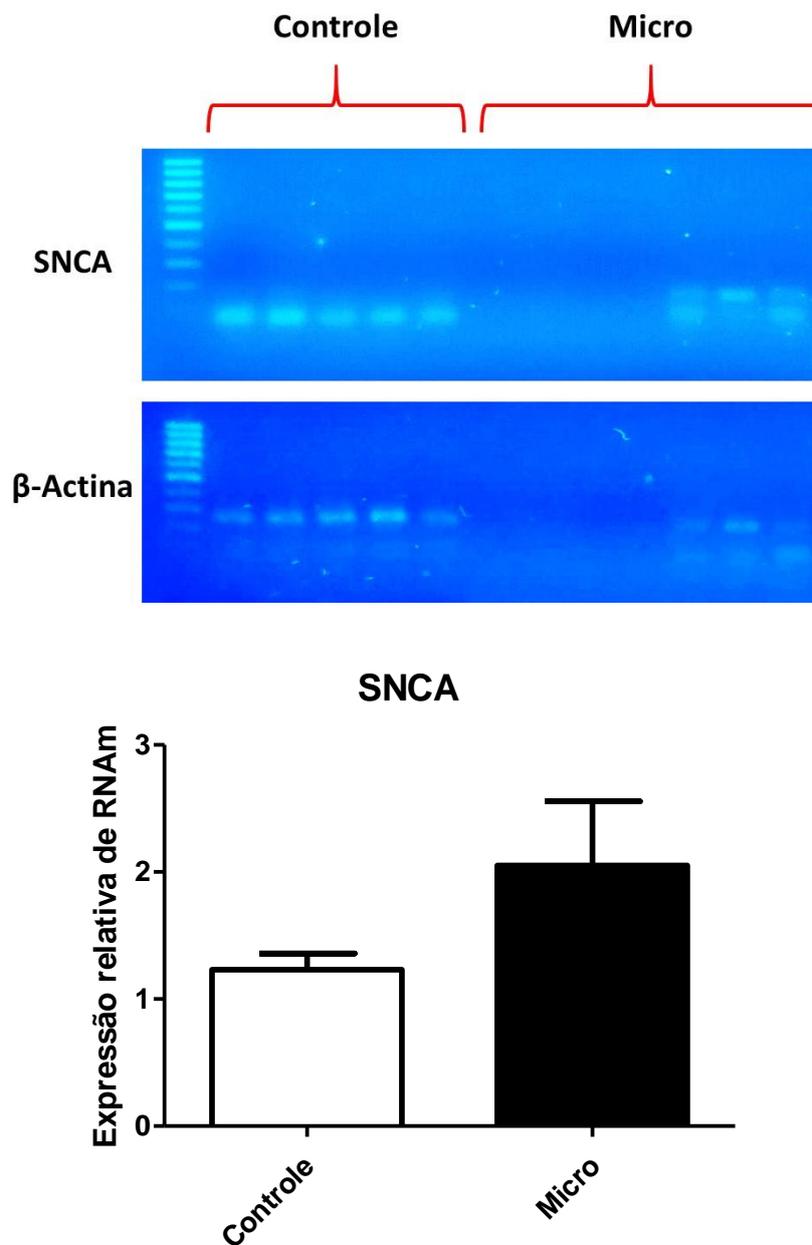


Figura 4: Expressão relativa de RNAm indicando aumento da expressão do gene SNCA em indivíduos microcefálicos. Painel superior apresenta géis representativos dos produtos de PCR para o gene SNCA e β -actina. Painel inferior apresenta gráfico em barras com análise dos resultados.

É importante destacar que todas as amostras foram submetidas à amplificação pela técnica da PCR, porém as alíquotas 5, 6, 7, 8 e 9 do grupo do controle e 7, 8 e 9 do grupo de crianças com microcefalia apresentaram validação da técnica.

Considerando que nas amostras dos indivíduos microcefálicos observou-se a presença de duas bandas, também fizemos a análise somando a densidade das duas bandas nesses indivíduos, como apresentado na Figura 5. Nessa análise também foi verificado aumento da expressão do gene SNCA nos indivíduos microcefálicos em relação aos indivíduos controle.

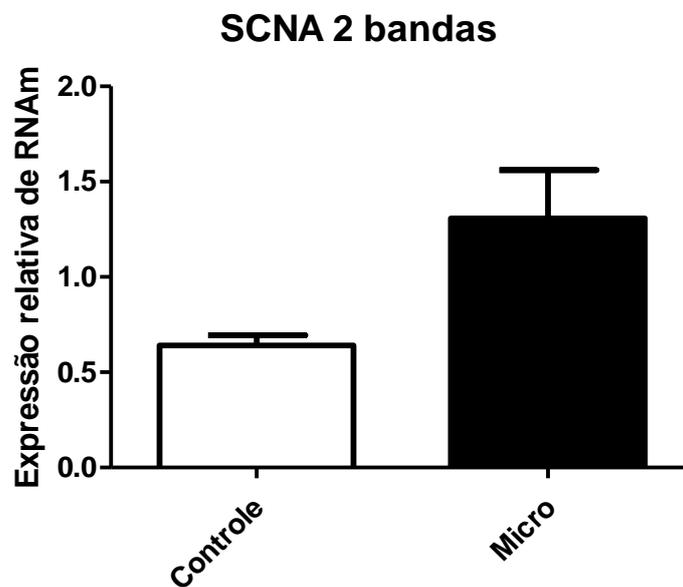
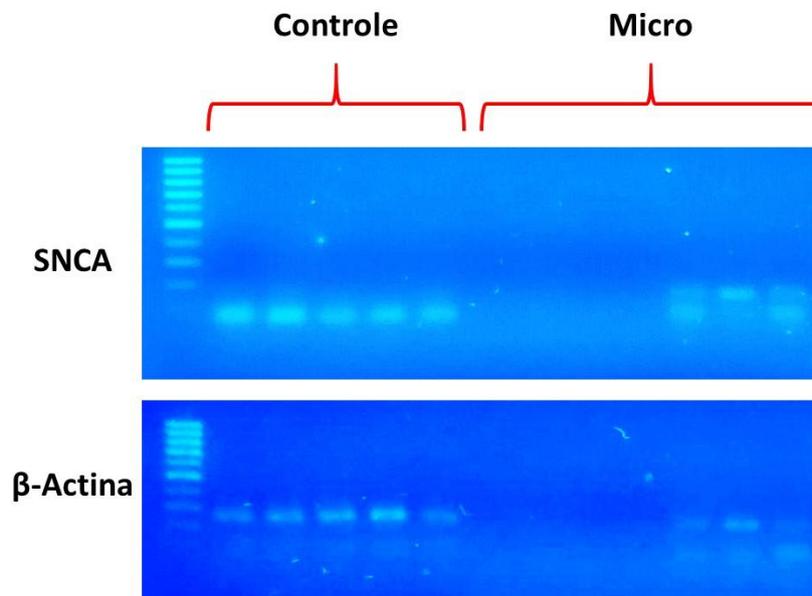


Figura 5: Expressão relativa de RNAm, utilizando duas bandas, indicando aumento da expressão do gene SNCA em indivíduos microcefálicos. Painel superior apresenta géis representativos dos produtos de PCR para o gene SNCA e β -actina. Painel inferior apresenta gráfico em barras com análise dos resultados.

5.6 Expressão do gene NRG

Em um microtubo de 0,2 mL, considerando o volume final da reação de 20 μ L, foram usados 0,8 μ L dos primer, 7,4 μ L de água e 1 μ L de cDNA, para o gene NRG (**Quadro 6**).

Quadro 6: Padronização da reação de PCR para o gene NRG.

Amostra	cDNA	Primer	Reação 1x
1	CT 5	NRG Zhang	<ul style="list-style-type: none">- Master Mix \rightarrow 10 uL- Primer Fw \rightarrow 0,8 uL- Primer Rv \rightarrow 0,8 uL- Água \rightarrow 7,4 uL- cDNA \rightarrow 1 uLVolume total = 20 uL Termociclagem: <ul style="list-style-type: none">95°C por 5min95°C por 1 min60°C por 45 seg.72°C por 40 seg.72° por 10 min. } 45x
2	CT 6	NRG Zhang	
3	CT 7	NRG Zhang	
4	CT 8	NRG Zhang	
5	CT 9	NRG Zhang	
6	MIC 2	NRG Zhang	
7	MIC 3	NRG Zhang	
8	MIC 4	NRG Zhang	
9	MIC 6	NRG Zhang	
10	MIC 7	NRG Zhang	
11	MIC 8	NRG Zhang	
12	MIC 9	NRG Zhang	
13	MIC 10	NRG Zhang	

Fonte: Autor, 2020

Após a amplificação das amostras pela PCR, realizamos a corrida dos produtos em gel de agarose, e observamos aumento significativo da expressão do gene NRG em indivíduos microcefálicos em relação aos indivíduos controle, como observado na Figura 6.

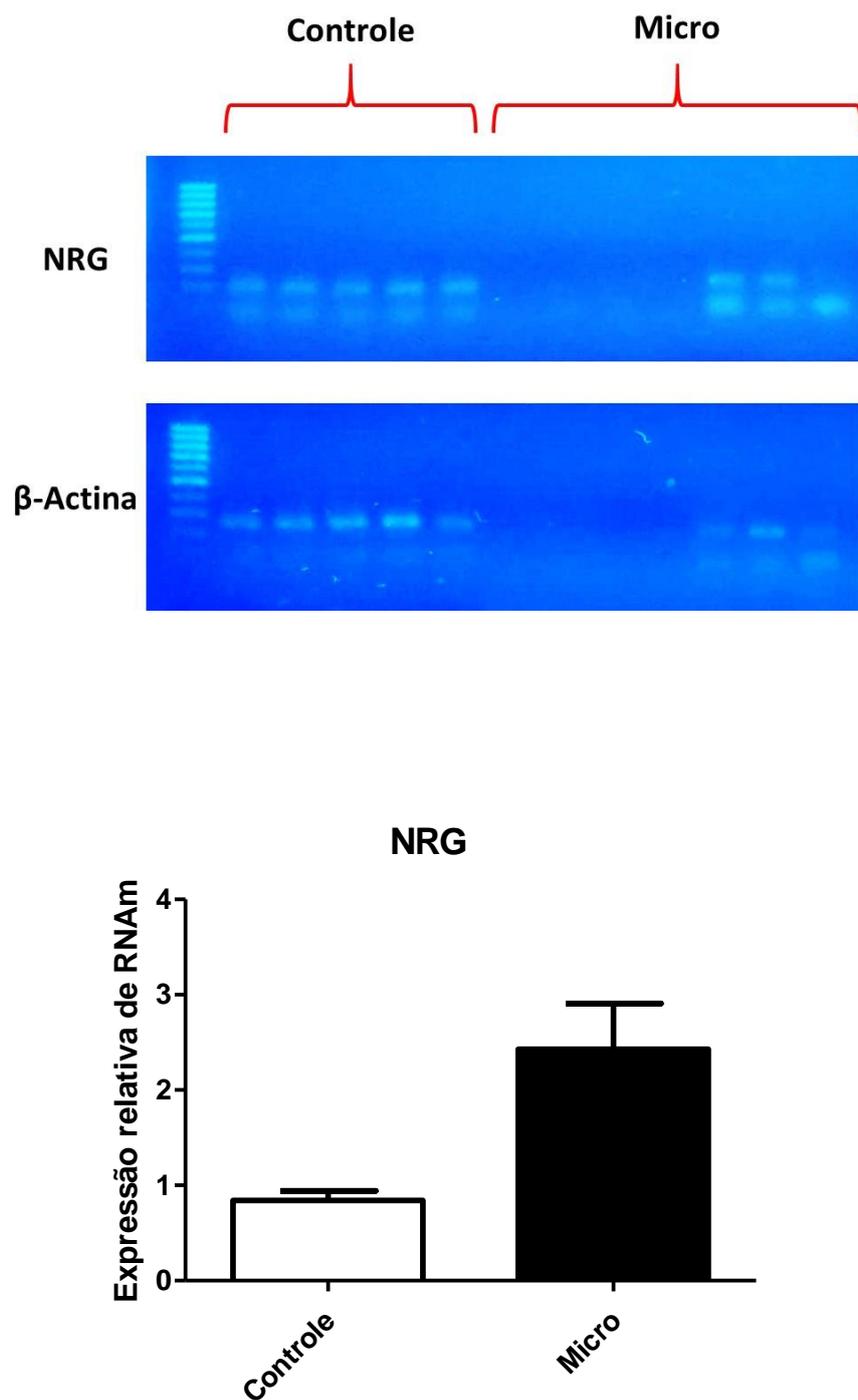


Figura 6: Expressão relativa de RNAm indicando aumento da expressão do gene NRG em indivíduos microcefálicos. Painel superior apresenta géis representativos dos produtos de PCR para o gene NRG e β -actina. Painel inferior apresenta gráfico em barras com análise dos resultados.

A microcefalia é uma condição definida como uma circunferência cranial diminuída ao nascimento (microcefalia congênita) ou após o nascimento (pós-natal ou microcefalia adquirida). É definida como uma redução de mais de 2 desvios padrões na circunferência da cabeça ou até uma redução maior que 3 desvios padrões nos casos de microcefalia grave (HANZLIK; GIGANTE, 2017).

A subnotificação e variações nas definições de caso nos estudos tornam difícil rastrear e relatar um real incidência da Microcefalia. Outra dificuldade no uso de desvios padrões para relatar, estudar e monitorar as microcefalias é o conceito de microcefalia proporcional, onde observa-se uma circunferência da cabeça abaixo de 2-3 desvios padrões da média com peso e altura também reduzidos. Embora o baixo peso ao nascer e a microcefalia proporcional tenham seus próprios conjunto de complicações e prognóstico, essas crianças não têm o mesmo prognóstico e tendências de resultados neurocognitivos como aqueles com microcefalia no cenário de peso e altura normais (HANZLIK; GIGANTE, 2017).

Existem várias causas genéticas e ambientais, que incluem aberrações cromossômicas, danos no DNA como consequência de alinhamento incorreto no fuso mitótico, consumo materno excessivo de álcool, infecções congênitas, uso de medicamentos teratogênicos durante a gravidez, lesão cerebral, distúrbios metabólicos, além do uso de drogas ilícitas durante a gravidez (FAHEEM et al., 2015 in NAVEED 2018). A microcefalia primária é uma desordem neurogênica durante o desenvolvimento e a secundária está associada a uma doença neurodegenerativa progressiva (NAVEED et al., 2018).

Os genes envolvidos na microcefalia primária desempenham papel na orientação do fuso mitótico ou no controle da divisão celular, que impacta o neurodesenvolvimento. Outro aspecto importante na patogênese da microcefalia são os genes relacionados ao sistema de reparo do DNA celular (SHAHEEN et al., 2019).

Dos marcadores identificados e analisados neste estudo, Lee et al, (2006) relatou que a Alfa-sinucleína interage com uma variedade de proteínas que desempenham funções relacionadas a

polimerização de tubulina na formação dos microtúbulos, sendo essencial na formação do fuso mitótico.

A alfa-sinucleína é uma proteína neuronal abundante sendo altamente expressa nos terminais pré-sinápticos dos nervos (BURRÉ, 2018). Maroteaux (1988) também detectou a alfa-sinucleína na membrana nuclear, daí veio seu nome Sin (Vesículas sinápticas) e Nucleína (membrana nuclear).

Vários estudos ainda relataram que a alfa-sinucleína se liga as mitocôndrias e, sua hiperexpressão pode resultar em fragmentação das mesmas. Essa degeneração mitocondrial também foi observada em camundongos transgênicos que super-expressavam a alfa-sinucleína (BURRÉ et al., 2018). Dessa forma aumento na expressão da alfa-sinucleína estariam envolvidas na degeneração neuronal e impactando a formação de novos neurônios.

Já a Neuregulina-1 é uma proteína vital para o neurodesenvolvimento e plasticidade neuronal (MEI; XIONG, 2008). A família da Neuregulina -1 compreende mais de 30 proteínas secretadas e ligadas à membrana, geradas por splicing alternativo, sendo suas principais isoformas as Neuregulinas-1 Tipo I, II e III (PAN; DOBROWSKY, 2013).

Zanazi et al., (2013) demonstrou que os Tipo I e II induzem desmielinização *in vitro*, estando esta resposta ligada a ativação da via MAPK, assim aumento da expressão na Neuregulina-1 estaria associado a estados fisiopatológicos ligados à neuropatia e degeneração da mielina.

Diante do exposto, verificamos, portanto, haver consonância entre nossos achados para microcefalia, em relação aos estudos que nortearam a escolha dos biomarcadores, indicando que esses biomarcadores podem ser utilizados para diagnóstico da microcefalia, e eventualmente fazerem parte de um painel de detecção de diferentes tipos de neurodegeneração.

Para tanto o desenho de um protótipo de teste de diagnóstico deve seguir as recomendações:

Componente A – Trizol

Componente B – Clorofórmio

Componente C – Álcool isopropílico

Componente D – Água livre de RNase e DNase

Componente E – DNase

Componente F – Primers Randômicos

Componente G – Solução Tampão para reação de PCR

Componente H – DNTp

Componente I – Transcriptase reversa

Componente J – Primer específico FW

Componente K – Primer específico RV

Componente L1 – Master Mix para PCR convencional

Componente L2 – Master Mix para PCR em tempo real

Extração de RNA

Componente A – Trizol

Componente B – Clorofórmio

Componente C – Álcool isopropílico

Componente D – Água livre de RNase e DNase

Síntese de cDNA

Componente E – DNase

Componente F – Primers Randômicos

Componente G – Solução Tampão para reação de PCR

Componente H – DNTp

Componente I – Transcriptase reversa

Amplificação dos genes específicos

Componente H – DNTp

Componente J – Primer específico FW

Componente K – Primer específico RV

Componente L1 – Master Mix para PCR convencional

Componente L2 – Master Mix para PCR em tempo real

Cabe destacar que o resultado da pesquisa permitiu o depósito de Pedido Nacional de Invenção, número do Processo: BR 10 2020 0061194^a, no Instituto Nacional de Propriedade Industrial. A presente invenção trata do processo para predição de microcefalia caracterizado pela utilização de componentes do sangue periférico que podem ser mensurados por reação de PCR convencional seguida de detecção por gel ou espectrofotometria, ou detecção e mensuração por PCR em tempo real, independentemente da idade do indivíduo e sem necessidade de sistemas de imagem direta, podendo ser associado a outros sistemas de detecção comuns em biologia celular e molecular, visando sua aplicação na medicina humana. A aplicabilidade dessa inovação resultará no preenchimento de uma

lacuna da saúde pública de apoio ao diagnóstico de microcefalia, doença pouco conhecida na literatura e com grande impacto social.

6. CONCLUSÃO

Baseado nos dados obtidos neste estudo, podemos concluir até o momento que, os genes Neuregulin e alpha-synuclein (SNCA) apresentam expressão diferencial em indivíduos diagnosticados com microcefalia, em relação a indivíduos controle, indicando que podem ser utilizados como biomarcadores para o diagnóstico da microcefalia. Importante ressaltar que essas análises foram realizadas a partir de amostras de sangue que são de fácil obtenção, condição importante para o desenvolvimento de um kit diagnóstico que possa auxiliar no diagnóstico da doença.

O alcance do objetivo do estudo, desenho do protótipo de um kit de diagnóstico para microcefalia trará o grande desafio de aperfeiçoar a tecnologia para beneficiar a ciência sem colocar em risco os direitos individuais da cidadania.

Por fim, destaca-se que o resultado dessa pesquisa proporcionará uma solução para reduzir o custo do diagnóstico de microcefalia e, conseqüentemente, a descentralização da coleta do exame para as unidades de saúde da família o que facilitará o diagnóstico de microcefalia, ou seja ocorrerá descentralização do diagnóstico do serviço de alta complexidade para a atenção primária em saúde. Tal evidência, corrobora com as diretrizes do Sistema Único de Saúde, para solucionar uma carência de organização da política de saúde voltadas atenção infantil das malformações congênitas, com destaque a microcefalia.

REFERÊNCIAS

ABUELO, D. **Microcephaly Syndromes. Seminars In Pediatric Neurology.** v. 14, n. 3, p.118-127, set. 2007. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.spen.2007.07.003>

Alves, J. L. **Avaliação da instabilidade genômica em crianças com microcefalia do Rio Grande do Norte.** Monografia (Graduação) - Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Bacharel em Biomedicina, Natal, 2019.

ARAKI, K, et al. **The localization of α -synuclein in the process of differentiation of human erythroid cells.** Int J Hematol. 2018 Aug;108(2):130-138.

Araújo, S.S. et al. **Microcephaly in north-east Brazil: a retrospective study on neonates born between 2012 and 2015.** Bull World Health Organ. 2016. 94(11): 835-840.

BARBELANNE, M; TSANG, W.Y. **Molecular and Cellular Basis of Autosomal Recessive Primary Microcephaly.** Biomed Res Int. 2014. 2014:547986.

BRASIL. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus zika.** Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015a.

_____. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika** – Versão 01/atualizado 08/12/2015. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2015b.

_____. **Portaria nº1813, de 11 de novembro de 2015.** Decreta a Emergência em Saúde Pública de Importância Nacional (ESPIN), por alteração no padrão de ocorrência de microcefalia. Diário Oficial da União da República Federativa do Brasil. Ministério da Saúde. Gabinete do Ministro Brasília, 11 nov. 2015c.

_____. **Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia** – Versão 01/atualizado 22/01/2016. Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. – Brasília: Ministério da Saúde, 2016.

_____. **Orientações integradas de vigilância e atenção à saúde no âmbito da Emergência de Saúde Pública de Importância Nacional: procedimentos para o monitoramento das alterações no crescimento e desenvolvimento a partir da gestação até a primeira infância, relacionadas à infecção pelo vírus Zika e outras etiologias infecciosas dentro da capacidade operacional do**

SUS. Secretaria de Vigilância em Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. [recurso eletrônico] / Ministério da Saúde – Brasília, 2017.

_____ **Boletim Epidemiológico, volume 50 | Nº 08 | Mar. 2019.** Disponível em <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/22/2019-001.pdf>. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Acesso em 18 de dezembro de 2019.

_____ **Microcefalia: causas, sintomas, tratamento e prevenção. Ministério da Saúde.** Disponível em: <<https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/microcefalia>>. Acesso em: 11 fev. 2020.

BROWN, D.J; LIN, B; HOLGUIN, B. **Expression of neuregulin 1, a member of the epidermal growth factor family, is expressed as multiple splice variants in the adult human cornea Invest Ophthalmol. Vis Sci.** 2004 Sep;45(9):3021-9.

CAMARGO, J.R.; KENNETH R. **Zika, microcefalia, ciência e Saúde Coletiva.** Physis 2016. 26(1):9-10.

CAPANEMA, C.R.; et al. **Biotecnologia para saúde humana: tecnologias, aplicações e inserção na indústria farmacêutica.** BNDES Setorial, 2009. 29:359-392.

ERCOLE, F.F.; MELO, L.S; ALCOFORADO, C.L.G. **Revisão Integrativa versus Revisão Sistemática.** Rev Min Enferm. 2014. 18(1): 1-260.

FAHEEM M; et al. **Molecular genetics of human primary microcephaly: an overview.** BMC Med. Gen.. 2015. 8(1):S4

Faye, O.; et al. **Molecular evolution of Zika virus during its emergence in the 20th century.** PLoS Negl Trop Dis. 2014;8:e2636.

GILI, J. A. et al. **Descriptive analysis of high birth prevalence rate geographical clusters of congenital anomalies in South America.** Birth Defects Research Part A: Clinical and Molecular Teratology, [S.l.], v. 106, p. 257-266, 2016.

GRAF, W.D.; et al. **Practice parameter: evaluation of the child with microcephaly (an evidence-based review): report of the quality standards subcommittee of the American Academy of Neurology and the Practice Committee of the Child Neurology Society.** Neurol.. 2010. 74(13):1080–1081.

GUIMARÃES, R. et al. **Política de Ciência, Tecnologia e Inovação em Saúde**. Ciênc. saúde colet. 24 (3) Mar 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/1413-81232018243.34652018>.

HANZLIK, E.; GIGANTE, J. **Microcephaly**. Children. 2017. 4(6), 47.

JORDÃO, L.A. **Avaliação da instabilidade genômica em crianças com microcefalia do Rio Grande do Norte. Monografia (Graduação)-Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Centro de Biociências, Bacharel em Biomedicina**. 2019. 77f.: il. 2019.

MAHMOOD, S; AHMAD, W; HASSAN, M.J. **Autosomal recessive primary microcephaly (MCPH): clinical manifestations, genetic heterogeneity and mutation continuum**. Orph J Rare Dis. 2011. 6(1):6-39.

MENDES, S.R.C.C.P.; GALVÃO, C.M. **Revisão integrativa: método de pesquisa para a incorporação de evidências na saúde e na enfermagem**. Enferm. 2008. 17(4):758-64.

NAVEED, M.; et al. **Comprehensive review on the molecular genetics of autosomal recessive primary microcephaly (MCPH)**. 2018. Genet. Res. 100, e7, 1–16.

NUNES, M. L.; et al. **Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil**. Jornal de Pediatria, [s.l.], v. 92, n. 3, p.230-240, maio 2016. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jped.2016.02.009>

O'DRISCOLL, M.; JEGGO, P. A.. **The role of the DNA damage response pathways in brain development and microcephaly: Insight from human disorders**. DNA Repair, v. 7, n. 7, p.1039-1050, jul. 2008. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.dnarep.2008.03.018>

VARGAS, A. et al. **Características dos primeiros casos de microcefalia possivelmente relacionados ao vírus Zika notificados na Região Metropolitana de Recife, Pernambuco**. Epidemiol Serv. Saude. 2016, 25(4):691-700.

VERLOES, A.; DRUNAT, S.; GRESSENS, P.; PASSEMARD, S. **Primary autosomal recessive microcephalies and Seckel syndrome spectrum disorders**. In GeneReviews (ed. Pagon RA, et al.), <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK9587>. University of Washington, Seattle, 2009.

VIANA, A. L. d'Á.; SILVA, H.P.; IBÁÑEZ, N.; IOZZI, F.L. **A política de desenvolvimento produtivo da saúde e a capacitação dos laboratórios públicos nacionais.** Cad. Saúde Pública 32 (Suppl 2) 03 Nov 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1590/0102-311X00188814>.

WATSON, M.B.; et al. **Regionally-specific microglial activation in young mice over-expressing human wildtype alpha-synuclein.** Exp Neurol. 2012 Oct;237(2):318-34.

WOODS, C. G. **Human microcephaly.** Current Opinion In Neurobiology. v. 14, n. 1, p.112-117, fev. 2004. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.conb.2004.01.003>.

ZANAZZI, G.; et al. **Glial growth factor/neuregulin inhibits Schwann cell myelination and induces demyelination.** J Cell Biol. 2001, 152:1289–1299

ZHANG, H.X.; et al. **Explorative study on the expression of neuregulin-1 gene in peripheral blood of schizophrenia.** Neurosci Lett. 2008 Jun 13;438(1):1-5.

APÊNDICES

APÊNDICE A

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA
DECLARAÇÃO DE COMPROMISSO E RESPONSABILIDADE

Eu, RENATA VALERIA NÓBREGA, aluna do Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, pesquisadora responsável, comprometo-me a desenvolver o projeto de pesquisa intitulado “DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA” sob a orientação do professor, Dr. ENÉAS RICARDO DE MORAIS GOMES.

Os pesquisadores ressaltam que irão assegurar os preceitos éticos previstos na Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde e demais documentos complementares. Destacamos que iremos nos responsabilizar pelo acompanhamento das atividades de pesquisa, entrega do relatório final ao Comitê de Ética os resultados da pesquisa para sua posterior divulgação no meio acadêmico e científico.

JOÃO PESSOA- PB, 18 DE NOVEMBRO DE 2016.


ENÉAS RICARDO DE MORAIS GOMES


RENATA VALÉRIA NÓBREGA

APÊNDICE B

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

DECLARAÇÃO DE AUTORIZAÇÃO INSTITUCIONAL PARA USO DE
BANCO DE DADOS

Eu, ROBERTA BATISTA ABATH, Secretária de Estado da Saúde, autorizo a realização da Pesquisa "DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA", mediante parecer de aprovação de Comitê de Ética em Pesquisa.

O estudo será realizado pela pesquisadora responsável RENATA VALÉRIA NOBREGA, aluna do Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa. Sob a orientação do professor Dr. ENÉAS RICARDO DE MORAIS GOMES.

O autorizo da Instituição torna-se necessário para consultar os registros dos casos notificados de Microcefalia na base de dados de Registro de Eventos de Saúde Pública (RESP – Microcefalias). Além disso, a autorização para que o nome desta instituição possa constar no relatório final como em futuras publicações no formato de artigo científico.

Ressaltamos que os dados coletados sejam mantidos em absoluto sigilo de acordo com a Resolução do Conselho de Saúde (CNS/MS) 466/12 que trata de pesquisa envolvendo Seres Humanos, salientando ainda que tais dados sejam utilizados tão somente para realização desse estudo.

JOÃO PESSOA- PB, 18 DE NOVEMBRO DE 2016.

Roberta Batista Abath
Secretária de Estado da Saúde
Município de João Pessoa
CPF: 994.424.766-15

ROBERTA BATISTA ABATH

APÊNDICE C

UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA CENTRO DE BIOTECNOLOGIA PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TERMO DE ANUÊNCIA

A Secretaria de Estado da Saúde da Paraíba (SES/PB) está de acordo com a execução do projeto “**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA**”, coordenado pela pesquisadora RENATA VALERIA NÓBREGA, aluna do Doutorado do Programa de Pós Graduação em Biotecnologia, Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, sob a orientação do professor Dr. ORIENTADOR ENÉAS RICARDO DE MORAIS GOMES. O referido programa de pós graduação assume o compromisso de apoiar o desenvolvimento da pesquisa nesta Instituição durante sua realização.

Declaramos conhecer e cumprir as Resoluções Éticas Brasileiras, em especial a Resolução 466/2012 do CNS, bem como estamos ciente de suas co-responsabilidades como instituição coparticipante do presente projeto de pesquisa, e de seu compromisso no resguardo da segurança e bem-estar dos sujeitos de pesquisa nela recrutados, dispondo de infra-estrutura necessária para a garantia de tal segurança e bem-estar.

João Pessoa, 18 de Novembro de 2016.

Roberta Batista Abath
Secretaria de Estado da Saúde
Matrícula 182.625-9
CPF: 904.424.744-15

ROBERTA BATISTA ABATH
Secretária de Estado da Saúde - PB

APÊNDICE D
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

O (A) Senhor (a) está sendo convidado (a) a participar de uma pesquisa “**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA**” como voluntária. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o (a) senhor (a) não consiga entender, o pesquisador responsável pelo estudo e a equipe desta pesquisa estarão disponíveis para esclarecê-los.

A proposta deste termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) é explicar tudo sobre o estudo e solicitar a sua permissão para participar do mesmo.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

Objetivo do estudo

O objetivo geral do estudo é desenvolver kit diagnóstico para identificação de Microcefalia.

Duração do Estudo

A duração máxima do estudo será de 04 anos, podendo ser antecipado a apresentação dos dados finais mediante finalização de todas as etapas do estudo e a magnitude do problema de saúde pública.

A sua participação no estudo será de aproximadamente 4 horas, tempo necessário para fazer a entrevista e coleta de sangue da criança.

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 10 indivíduos.

Este estudo será realizado nos estabelecimentos de saúde do Estado da Paraíba que integram a Rede do Circulo do Coração e Centro de Biotecnologia da UFPB.

O (a) senhor (a) e seu filho (a) foram escolhidos (a) a participar do estudo por que queremos desenvolver um teste diagnóstico para casos de microcefalia, desde que atenda aos seguintes critérios:

- 1) Residência no estado da Paraíba
- 2) Mãe maior de 12 anos de idade
- 3) Casos e controles atendam às respectivas definições de caso
- 4) A mãe, pai ou pais da mãe do bebê assinem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O (a) senhor (a) e seu filho (a) não poderão participar do estudo se apresentarem:

- 1) Mãe menor de 12 anos de idade
- 2) Desnutrição grave
- 3) Comprometimento ou suspeita de comprometimento da função imunológica, inclusive infecção pelo HIV, imunodeficiência primária, ingestão de corticosteróides orais ou injetáveis (ou equivalentes), ingestão de fármacos quimioterápicos ou imunomoduladores, entre outros.
- 4) Administração de imunoglobulina ou de outros produtos hemoderivados nos 60 dias anteriores ao recrutamento
- 5) Qualquer doença que, na opinião do investigador, possa constituir um risco de saúde para sua capacidade de participar da pesquisa e fornecer uma amostra de sangue.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar, será realizada uma coleta de dados com a mãe ou responsável pela criança tendo como base o questionário de investigação dos casos de microcefalia já disponível no protocolo de do Ministério da Saúde, o qual contempla: dados do serviço de saúde, dados do recém-nascido, informações gerais, exame físico ao nascer; presença de outras malformações, outros achados clínicos, exames inespecíficos, exames etiológicos, exames de imagem, Entrevista com a mãe, identificação e dados sociodemográficos, antecedentes, hábitos durante a gestação e dados do pré-natal.

Uma vez coletadas as informações, as crianças serão submetidos à coleta do sangue, por meio de técnica asséptica padrão para a coleta das amostras de sangue por punção venosa. Uma amostra de separador de soro será coletada da criança, até 3 ml. Serão necessários, no mínimo, 500 microlitros de sangue total para a realização da pesquisa. A família também será perguntada se sua amostra pode ser armazenada para futuros trabalhos sobre o vírus Zika e vírus correlatos. A família não precisa comprometer-se com o armazenamento da amostra a ser incluída na pesquisa. Por fim, a mãe será perguntada se os prontuários médicos da criança podem ser examinados para a verificação de resultados de exames de imagem e exames para detecção de doenças infecciosas.

Destaca-se que as amostras serão armazenadas em gelo durante o dia até que possam ser trazidas para o laboratório do Centro de Biotecnologia da UFPB, onde serão seguidas as etapas de desenvolvimento do kit diagnóstico para identificação de Microcefalia.

Benefícios da Pesquisa

Tendo em vista a importância do estudo, destaca-se que os benefícios são bem mais distintos que os riscos. As crianças serão beneficiadas por saber se foram infectados ou não pelo vírus Zika, já que receberão seus resultados nos serviços de saúde de coleta das amostras. Saber se alguém foi infectado pelo vírus Zika é considerado benéfico, tendo em vista que a infecção deve conferir imunidade para o resto da vida. Portanto, não se prevê que a pessoa adoça por causa do vírus Zika no futuro (ou seja, poderá excluir infecção pelo Zika no diagnóstico diferencial caso se apresente ao serviço de saúde no futuro com sintomas semelhantes) e não constituirão risco para outros membros da família se o vírus estiver circulando na área. Além disso, irão contribuir para o desenvolvimento de kit para diagnóstico específico dos agentes causadores relacionados a Microcefalia.

Riscos da pesquisa

Os participantes do estudo têm o risco de revelação involuntária de informações de saúde pessoais para pessoas alheias à equipe de investigação. Contudo, a equipe de investigação irá procurar mitigar este risco por meio da manutenção das informações pessoalmente identificáveis em um local sob chave. Além disso, todos os dados dos participantes serão inseridos pelo número de identificação exclusivo em um banco de dados eletrônico. A coleta de sangue pode gerar um ligeiro desconforto e hematomas. É baixo o risco de infecção associado à coleta de sangue. No entanto, equipes treinadas aplicarão uma técnica estéril para ajudar a minimizar eventuais riscos. A família não terá de arcar com os custos da coleta de sangue.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo/Descontinuação do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total

liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Importante esclarecer, que o pesquisador poderá retirá-lo do estudo, caso os procedimentos do estudo possam apresentar algum risco para a sua saúde, ou em casos de complicações devido aos procedimentos. Mas isso tudo será devidamente informado ao Sr (a). Além disso, tanto o pesquisador, como as autoridades regulatórias (Comitê de Ética em Pesquisa), poderá interromper o estudo, caso julgue que o mesmo possa apresentar algum dano aos participantes.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Dessa forma, se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

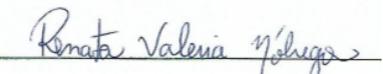
Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são RENATA VALERIA NÓBREGA (Pesquisador principal) e ENÉAS RICARDO DE MORAIS GOMES (Pesquisador auxiliar) que poderão ser encontrados na Gerência de Vigilância em Saúde/SES-PB e Centro de Biotecnologia/Universidade Federal da Paraíba ou nos respectivos telefones: 083 999043834 e 083 986301235.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) a Secretaria de Estado da Saúde, através do telefone (83) 3218 7357 / 83 3218 7768 ou pelo e-mail: cep@saude.pb.gov.br

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado “**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA**”. Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização dos meus registros (prontuários) pelo pesquisador.

Nome do Participante da Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina	Data
Assinatura do Participante da Pesquisa	
Nome do Representante Legal do Participante da Pesquisa Letra de Forma ou à Máquina (quando aplicável)	Data
Assinatura do Representante Legal do Participante da Pesquisa (quando aplicável)	
Nome da pessoa obtendo o Consentimento	Data
Assinatura da Pessoa Obtendo o Consentimento	
Renata Valeria Nóbrega Nome do Pesquisador Principal	Data
 Assinatura e Carimbo do Pesquisador Principal	

Importante: Este documento é elaborado e deverá ser assinado em duas vias: uma será entregue ao participante (sujeito da pesquisa) e a outra via ficará com o pesquisador. Todas as páginas deverão ser rubricadas pelo pesquisador, pelo participante da pesquisa ou seu representante legal, em atendimento as recomendações do CEP.

APÊNDICE E
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA
CENTRO DE BIOTECNOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

TERMO DE ASSENTIMENTO INFORMADO LIVRE E ESCLARECIDO (Pais ou responsáveis das mães menores de 18 anos)

Informação geral: O assentimento informado para a adolescente não substitui a necessidade de consentimento do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O assentimento significa que você concorda em fazer parte de um grupo de adolescentes, da sua faixa de idade, para participar de uma pesquisa. Serão respeitados seus direitos e você receberá todas as informações por mais simples que possam parecer.

Título do Projeto: DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA.

Investigador: Renata Valeria Nóbrega/ Enéas Ricardo de Moraes Gomes

Informação ao sujeito da pesquisa:

Descrição do Estudo

Participarão do estudo aproximadamente 10 indivíduos.

Este estudo será realizado nos estabelecimentos de saúde do Estado da Paraíba que integram a Rede do Circulo do Coração.

O (a) senhor (a) e seu filho (a) foram escolhidos (a) a participar do estudo por que queremos desenvolver um teste diagnóstico para casos de microcefalia, desde que atenda aos seguintes critérios:

- 1) Residência no estado da Paraíba
- 2) Mãe maior de 12 anos de idade
- 3) Casos e controles atendam às respectivas definições de caso
- 4) A mãe, pai ou pais da mãe do bebê assinem o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O (a) senhor (a) e seu filho (a) não poderão participar do estudo se apresentarem:

- 1) Mãe menor de 12 anos de idade
- 2) Desnutrição grave
- 3) Comprometimento ou suspeita de comprometimento da função imunológica, inclusive infecção pelo HIV, imunodeficiência primária, ingestão de corticosteróides orais ou injetáveis (ou equivalentes), ingestão de fármacos quimioterápicos ou imunomoduladores, entre outros.
- 4) Administração de imunoglobulina ou de outros produtos hemoderivados nos 60 dias anteriores ao recrutamento
- 5) Qualquer doença que, na opinião do investigador, possa constituir um risco de saúde para sua capacidade de participar da pesquisa e fornecer uma amostra de sangue.

Procedimento do Estudo

Após entender e concordar em participar,, será realizada uma coleta de dados com a mãe ou responsável pela criança tendo como base o questionário de investigação dos casos de microcefalia já disponível no protocolo de do Ministério da Saúde, o qual contempla: dados do serviço de saúde, dados do recém-nascido, informações gerais, exame físico ao nascer; presença de outras malformações, outros achados clínicos, exames inespecíficos, exames etiológicos, exames de imagem, Entrevista com a mãe, identificação e dados sociodemográficos, antecedentes, hábitos durante a gestação e dados do pré-natal.

Uma vez coletadas as informações, as crianças serão submetidos à coleta do sangue, por meio de técnica asséptica padrão para a coleta das amostras de sangue por punção venosa. Uma amostra de separador de soro será coletada da criança, até 3 ml. Serão necessários, no mínimo, 500 microlitros de sangue total para a realização da pesquisa. A família também será perguntada se sua amostra pode ser armazenada para futuros trabalhos sobre o vírus Zika e vírus correlatos. A família não precisa comprometer-se com o armazenamento da amostra a ser incluída na pesquisa. Por fim, a mãe será perguntada se os prontuários médicos da criança podem ser examinados para a verificação de resultados de exames de imagem e exames para detecção de doenças infecciosas.

Destaca-se que as amostras serão armazenadas em gelo durante o dia até que possam ser trazidas para o laboratório do Centro de Biotecnologia da UFPB, onde serão seguidas as etapas de desenvolvimento do kit diagnóstico para identificação de Microcefalia.

Benefícios da Pesquisa

Tendo em vista a importância do estudo, destaca-se que os benefícios são bem mais distintos que os riscos. As crianças serão beneficiadas por saber se foram infectados ou não pelo vírus Zika, já que receberão seus resultados nos serviços de saúde de coleta das amostras. Saber se alguém foi infectado pelo vírus Zika é considerado benéfico, tendo em vista que a infecção deve conferir imunidade para o resto da vida. Portanto, não se prevê que a pessoa adoça por causa do vírus Zika no futuro (ou seja, poderá excluir infecção pelo Zika no diagnóstico diferencial caso se apresente ao serviço de saúde no futuro com sintomas semelhantes) e não constituirão risco para outros membros da família se o vírus estiver circulando na área. Além disso, irão contribuir para o desenvolvimento de kit para diagnóstico específico dos agentes causadores relacionados a Microcefalia.

Riscos da pesquisa

Os participantes do estudo têm o risco de revelação involuntária de informações de saúde pessoais para pessoas alheias à equipe de investigação. Contudo, a equipe de investigação irá procurar mitigar este risco por meio da manutenção das informações pessoalmente identificáveis em um local sob chave. Além disso, todos os dados dos participantes serão inseridos pelo número de identificação exclusivo em um banco de dados eletrônico. A coleta de sangue pode gerar um ligeiro desconforto e hematomas. É baixo o risco de infecção associado à coleta de sangue. No entanto, equipes treinadas aplicarão uma técnica estéril para ajudar a minimizar eventuais riscos. A família não terá de arcar com os custos da coleta de sangue.

Compensação

Você não receberá nenhuma compensação para participar desta pesquisa e também não terá nenhuma despesa adicional.

Participação Voluntária/Desistência do Estudo/Descontinuação do Estudo

Sua participação neste estudo é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser. A não participação no estudo não implicará em nenhuma alteração no seu acompanhamento médico tão pouco alterará a relação da equipe com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total

liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar do estudo se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do tratamento e acompanhamento na instituição.

Importante esclarecer, que o pesquisador poderá retirá-lo do estudo, caso os procedimentos do estudo possam apresentar algum risco para a sua saúde, ou em casos de complicações devido aos procedimentos. Mas isso tudo será devidamente informado ao Sr (a). Além disso, tanto o pesquisador, como as autoridades regulatórias (Comitê de Ética em Pesquisa), poderá interromper o estudo, caso julgue que o mesmo possa apresentar algum dano aos participantes.

Novas Informações

Quaisquer novas informações que possam afetar a sua segurança ou influenciar na sua decisão de continuar a participação no estudo serão fornecidas a você por escrito. Dessa forma, se você decidir continuar neste estudo, terá que assinar um novo (revisado) Termo de Consentimento informado para documentar seu conhecimento sobre novas informações.

Em Caso de Danos Relacionados à Pesquisa

Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), o participante tem direito a tratamento médico na Instituição.

Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP. Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida

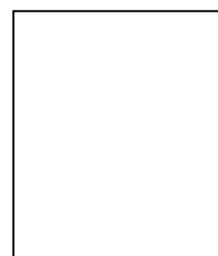
Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são RENATA VALERIA NÓBREGA (Pesquisador principal) e ENÉAS RICARDO DE MORAIS GOMES (Pesquisador auxiliar) que poderão ser encontrados na Gerência de Vigilância em Saúde/SES-PB e Centro de Biotecnologia/Universidade Federal da Paraíba ou nos respectivos telefones: 083 999043834 e 083 986301235.

Em caso de dúvidas ou preocupações quanto aos seus direitos como participante deste estudo, o (a) senhor (a) pode entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) a Secretaria de Estado da Saúde, através do telefone (83) 3218 7357 / 83 3218 7768 ou pelo e-mail: cep@saude.pb.gov.br

Declaração de Consentimento

Concordo em participar do estudo intitulado “**DESENVOLVIMENTO DE TESTE DIAGNÓSTICO PARA CASOS DE MICROCEFALIA**”. Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo do estudo, bem como seus possíveis benefícios e riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre o estudo e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa. Entendo que ao assinar este documento, não estou abdicando de nenhum de meus direitos legais.

Eu autorizo a utilização dos meus registros (prontuários) pelo pesquisador.



Nome

Assinatura do Responsável pelo adolescente ou impressão datiloscópica

—

Nome

Assinatura do Pesquisador

João Pessoa-PB, ____/____/____

ANEXOS

ANEXO 01

Questionário de investigação para microcefalia/Ministério da Saúde

Dados do serviço de saúde

Tipo: Hospital público Hospital particular Hospital filantrópico Domicílio Outros. Se outros, especificar:

Identificação do serviço de saúde: _____

Município de ocorrência: _____

Prontuário: _____

Dados do recém-nascido

Informações gerais

Data da ocorrência do parto: ___ / ___ / _____

Sexo: Masculino Feminino Indeterminado

Idade gestacional:

_____ semanas ____ dias

Classificação quanto à idade gestacional: Pré-termo Termo Pós-termo

Gemelar: Sim Não. Se sim, especificar: 1º Gemelar 2º Gemelar 3º Gemelar

Tipo de parto: Normal (Vaginal) Fórceps Cesáreo

Ocorreu dano perinatal? Sim Não – Se sim, qual: Anóxico Isquêmico hemorrágico traumático

outros, especificar: _____

Exame físico ao nascer

Peso (g):	Estatura (cm):	Perímetro cefálico (cm):	Perímetro torácico (cm):
Índice de Apgar:	1º min:	5º min:	10º min:

Presença de outras malformações: Sim Não

Se sim, especificar:

Aparelho circulatório

Aparelho respiratório

Aparelho digestivo

Órgãos genitais

Aparelho osteomuscular

Descreva a malformação encontrada: _____

Houve outros achados clínicos? Sim Não – Se sim, especificar:

- icterícia
- anemia
- esplenomegalia
- alterações ósseas
- choro ao manuseio
- hidropsia
- rinite muco-sanguinolenta
- hepatomegalia
- lesões cutâneas
- pseudoparalisia
- petéquias
- plaquetopenia
- convulsões
- outras, especificar:

Exames inespecíficos

Hemograma (considerar o primeiro): Sim Não - Data da realização: ___/___/___

Hb (mg/dl)	Ht (%)	Leucócitos (mm ³)	Bastonetes (%)	Segmentados (%)	Monócitos (%)	Linfócitos (%)	Plaquetas (mm ³)	Glicose (mg/dl)

Punção líquórica: Sim Não – Data da realização: ___/___/___

Aspecto: Límpido Purulento Hemorrágico Turvo Xantocrômico Outros Ignorado

Hemácias (mm ³)	Leucócitos (mm ³)	Bastonetes (%)	Segmentados (%)	Monócitos (%)	Linfócitos (%)	Proteínas (mg/dl)	Cloretos (mg/dl)	Glicose (mg/dl)

Exames etiológicos

Atenção! Preencher os resultados conforme a legenda:

[1] Reagente/Positivo [2] Não reagente/Negativo [3] Inconclusivo [4] Não realizado

Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Rubéola	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Citomegalovírus	Soro do RN				
	Líquor				

	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Herpes vírus	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Parvovírus	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Toxoplasmose	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	Resultado	Titulação	Treponêmico
Sífilis	Soro do RN			1:	
	Líquor			1:	
	Urina			1:	
Agente	Amostra	Data coleta	Teste rápido	Sorologia	WB
HIV	Soro do RN				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Zika vírus	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Chikungunya	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				
Agente	Amostra	Data coleta	IgM	IgG	PCR
Dengue	Soro do RN				
	Líquor				
	Urina				

Exames de imagem

Tomografia craniana: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: __ / __ / ____

Resultado: Normal calcificações lisencefalia atrofia cerebral ventriculomegalia suturas calcificadas outras,
especificar: _____

Ressonância magnética craniana: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: __ / __ / ____

Resultado: Normal calcificações lisencefalia atrofia cerebral ventriculomegalia suturas calcificadas outras,
especificar: _____

Ultrassom transfontanela: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: __/__/____
Resultado: Normal calcificações lisencefalia atrofia cerebral ventriculomegalia suturas calcificadas outras,
especificar: _____

Ultrassom abdominal: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: __/__/____
Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar:

Ecocardiograma: Sim Não Aguardando – Se sim, data da realização: __/__/____
Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar:

Outros exames realizados

Fundo do olho: Sim Não – Se sim, data da realização: __/__/____
Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar:

Teste da orelhinha: Sim Não – Se sim, data da realização: __/__/____
Foi encontrada alguma alteração: Sim Não – Se sim, especificar:

Entrevista com a mãe

Identificação e dados sociodemográficos

Nome: _____

Data de nascimento: __/__/__ _____ Idade: _____ anos

Raça/Cor: Branca Preta Amarela Parda Indígena (Etnia: _____) Ignorado

Escolaridade (considerar o maior nível completo): Sem escolaridade Fundamental I Fundamental II

Médio Superior Ignorado

Estado civil: Solteira Casada Viúva Separada/Divorciada União estável Ignorado

Ocupação:

Quantas pessoas moram na sua casa: _____

Qual é a renda familiar mensal: _____ reais

Endereço atual

Estado: _____ Município:

Logradouro: _____

Número: _____

Bairro: _____ **Telefones:**

Morou em outro endereço durante a gestação? [] Sim [] Não – Se sim:

Estado: _____ **Município:**

Logradouro: _____

Número: _____

Bairro: _____

Viajou durante a gestação? [] Sim [] Não – Se sim:

Data da Ida: ___ / ___ / ___ Data da Volta: ___ / ___ / ___ País: _____ Estado: ___

Município: _____

Data da Ida: ___ / ___ / ___ Data da Volta: ___ / ___ / ___ País: _____ Estado: ___

Município: _____

Antecedentes

Há algum grau de parentesco com o seu companheiro? [] Sim [] Não – Se sim, qual:

Você possui alguma malformação congênita? [] Sim [] Não – Se sim, qual (is):

Há alguém na sua família, ou na do seu companheiro, que nasceu com microcefalia? [] Sim [] Não

Você fazia uso de algum medicamento de uso contínuo? [] Sim [] Não – Se sim, Especificar:

Teve diagnóstico de alguma doença pré-existente? [] Sim [] Não – Se sim, qual (is):

[] Diabetes [] Outras doenças metabólicas [] Hipertensão arterial sistêmica [] Cardiopatia crônica []
Doença renal crônica [] Pneumopatias crônicas [] Hemoglobinopatia [] Câncer [] Doença auto-imune []
Doença neuroléptica [] Outras,
especificar: _____

Teve diagnóstico ou recebeu tratamento para alguma doença sexualmente transmissível? [] Sim []

Não

Se sim, qual (is): [] HIV [] Sífilis [] Gonorreia [] Clamídia [] Hepatites B e/ou C [] Herpes simples

[] Outras,

especificar: _____

Histórico obstétrico/ginecológico

Primeira gestação? [] Sim [] Não – Se sim, pular para dados da gestação. Se não, continuar:

Quantas vezes você já engravidou (considerar abortos e natimortos)? _____

Quantos filhos nasceram vivos? _____

Quantos filhos nasceram mortos? _____

Já teve algum aborto? [] Sim [] Não – Se sim, quantos: _____

Algun destes nasceu com alguma malformação congênita? Sim Não – Se sim, qual (is):

Qual é a data de nascimento do seu último filho? ___ / ___ / ___

Durante a gestação

Teve contato com pesticidas? Sim Não – Se sim, especificar:

Teve contato com agrotóxicos? Sim Não – Se sim, especificar:

Teve contato com algum produto químico? Sim Não – Se sim, especificar:

Realizou algum exame de raio-X? Sim Não – Se sim: 1º trimestre 2º trimestre 3º trimestre

Você fez uso de algum destes medicamentos?

Acido fólico: Sim Não – Se sim, data que iniciou o tratamento: ___ / ___ / ___

Ferro: Sim Não – Se sim, data que iniciou o tratamento: ___ / ___ / ___

Outros: Sim Não Se sim: Quais:

Medicamento 1: _____ data que iniciou o tratamento: ___ / ___ / ___

Medicamento 2: _____ data que iniciou o tratamento: ___ / ___ / ___

Medicamento 3: _____ data que iniciou o tratamento: ___ / ___ / ___

Medicamento 4: _____ data que iniciou o tratamento: ___ / ___ / ___