

**Universidade Federal de Pernambuco
Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami
Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde**

ROSÁRIO DE FÁTIMA BEZERRA MONTEIRO

**ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM PACIENTES
INFECTADOS POR ARBOVÍRUS**

Recife
2017

ROSÁRIO DE FÁTIMA BEZERRA MONTEIRO

**ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM PACIENTES
INFECTADOS POR ARBOVÍRUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Recife
2017

Catálogo na fonte
Elaine Barroso
CRB 1728

Monteiro, Rosário de Fátima Bezerra

Análise dos níveis séricos de vitamina D em pacientes infectados por arbovírus. / Rosário de Fátima Bezerra Monteiro - Recife: O Autor, 2017.

64 folhas: il., fig., tab.

Orientador: Danielly Bruneska Gondim Martins

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco.

Centro de Biociências. Biologia Aplicada à Saúde, 2017.

Inclui referências

1. Arboviroses 2. Microcefalia 3. Vitamina D I. Martins, Danielly Bruneska Gondim (orient.) II. Título

616.9

CDD (22.ed.)

UFPE/CB-2018- 044

ROSÁRIO DE FÁTIMA BEZERRA MONTEIRO

**ANÁLISE DOS NÍVEIS SÉRICOS DE VITAMINA D EM PACIENTES
INFECTADOS POR ARBOVÍRUS**

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Aplicada à Saúde do Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami – LIKA/UFPE, como requisito para a obtenção do título de mestre.

Orientadora: Danyelly Bruneska Gondim Martins

Aprovada em: 15/03/2017

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins/UFPE

Prof^a. Dr^a. Rosângela Ferreira Frade de Araújo/UFPE

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Sampaio Feitosa/UFPE

A minha mãe Ivanilda Bezerra Monteiro pelo exemplo
em vida, de fé, amor, sabedoria e resiliência, base
fundamental para o que sou,

Dedico

AGRADECIMENTOS

Ao Deus Pai, Filho e Espírito Santo; pois creio que tudo o que tornei-me, foi permissão e graça Dele(s).

Aos meus pais José Monteiro Sobrinho e Ivanilda Bezerra Monteiro (in memorian), por tudo que sempre fizeram por mim, minha base.

Ao meu esposo João Bosco e filhos Maria Luísa e Rafael, pelo amor, incentivo, compreensão das ausências e parceria ao longo de toda essa etapa.

A minha orientadora, Prof^a. Dr^a. Danyelly Bruneska Gondim Martins, tanto por ter me aceitado, como pela orientação, ensinamentos, parceria, paciência e por ter sobretudo, acreditado em mim.

Ao meu co-orientador Prof. Dr. José Luiz de Lima Filho, pela receptividade no LIKA e ter-me apresentado a esse magnífico mundo científico.

Aos meus irmãos e família, pela torcida e apoio, não só nesse momento, mas em toda minha vida.

Aos amigos da Prospecmol, em especial Maria Amélia e Andriu Catena, pela ajuda e parceria na realização desse trabalho, vocês fizeram a diferença e tenho certeza que com suas capacidades vão longe nesse universo acadêmico, tenho plena convicção.

A Doutoranda Elisa Almeida pela disponibilidade, apoio e ajuda nessa reta final, onde corri contra o tempo.

Ao amigo Marcos Carvalho, pois sempre acreditou na minha capacidade profissional, e foi uma das primeiras pessoas a me incentivar nesse meu sonho de tornar-me mestre.

Aos amigos que fazem parte do Hospital das Clínicas, em especial: Lúcia Reis, Eduardo Pinho, Osnir Viana, Madi Diniz, Silvana Silveira, Epitácio Villar e Geórgia Cruz, por toda ajuda na realização da pesquisa e parceria na chefia da Unidade de Laboratório do HC.

Enfim, gratidão a todos que sempre me incentivaram e foram parceiros ao longo dessa etapa, desse meu sonho realizado.

Os meus sinceros agradecimentos.

Se, na verdade, não estou no mundo para simplesmente a ele me adaptar, mas para transformá-lo; se não é possível mudá-lo sem um certo sonho ou projeto de mundo, devo usar toda possibilidade que tenha para não apenas falar de minha utopia, mas participar de práticas com ela coerentes.

Paulo Freire.

RESUMO

Desde 2015 o Brasil tem registrado casos de infecção por Arbovírus e de nascimentos de crianças com microcefalia no Nordeste do país. Neste período, os vírus CHIKV e ZIKV se disseminaram nesta região, mas o impacto destas infecções ainda não está esclarecido na população. Por outro lado, a sintomatologia da infecção por ZIKV e CHIKV se confundem em alguns momentos, levando a possíveis erros diagnósticos devido à sua diversidade. Enquanto estudos epidemiológicos e genéticos do vírus estão sendo realizados, faz-se necessário ampliar os estudos sobre a condição do hospedeiro na infecção viral. Desta forma, o presente estudo teve por objetivo avaliar os níveis de vitamina D em pacientes acometidos por infecção por Arbovírus, além de crianças portadoras de microcefalia. Amostras de soro foram utilizadas para realização dos testes sorológicos de diagnóstico das arboviroses e para dosagem de vitamina D. As análises estatísticas foram realizadas considerando significativos valores de p menores que 0,05. Foram incluídos 179 pacientes no estudo, subsequentemente divididos em dois grupos sendo constituídos de adultos e grávidas ($n=91$) além do binômio mãe/criança com microcefalia ($n=88$). A análise de concentração de vitamina D mostrou que 58,56% dos 179 pacientes apresentou suficiência. No grupo dos adultos, 95% apresentou-se DENV-IgG+ e 59,46% foram ZIKV-IgG+ com vitamina D suficiente. Neste grupo os sintomas cefaléia e diarreia foram estatisticamente relacionados a pacientes ZIKV-IgG+; enquanto a ocorrência paralisia dos membros foi relacionada aos níveis de vitamina D em ZIKV-IgG+ e a *rash* cutânea significativamente associada a níveis de vitamina D em pacientes ZIKV-IgG+ e CHIKV-IgG+. No grupo de mães e crianças, 60,87% das mães apresentou valores suficiente para vitamina D e dentre elas 92,86% ZIKV-IgG+. Em crianças, 57,14% apresentou níveis satisfatórios de vitamina D. Apesar de não ter sido encontrada diferença estatística, foi observado que a maioria dos indivíduos suficientes para vitamina D não apresentaram sorologia positiva para os arbovírus. Os resultados obtidos têm grande importância para o conhecimento sobre a relação causa-efeito das Arboviroses na população. Futuros estudos devem ser realizados numa coorte maior visando determinar o papel da 25(OH)vitamina D como molécula imunomoduladora, desde os níveis considerados suficientes até a regulação hormonal e enzimática.

Palavras-chave: Arbovírus. Microcefalia. Vitamina D.

ABSTRACT

Since 2015 Brazil has registered cases of Arbovirus infection and of nutrition for children with microcephaly in the Northeast of Brazil. In this period, the CHIKV and ZIKV viruses spread in this region, but the populational impact of these infections still not clear. On the other hand, the ZIKV and CHIKV infections symptomatology may be confused, leading to diagnostic mistakes. While epidemiological and genetic studies of the virus are being conducted, it is important to elucidate the host's condition in viral infection. Thus, the present study aimed to evaluate vitamin D levels in patients with Arbovirus infection, as well as children with microcephaly. Serum samples were used to perform serological tests for the diagnosis of arboviruses and vitamin D dosing. Statistical analyzes were performed using the graphpad Prism software, with significance to p values lower than 0.05. A total of 179 patients included in this study, they were subsequently divided into two groups consisting of adults and pregnant (n=91) and the binomium mother/child with microcephaly (n=88). The analysis of vitamin D concentration showed 58.56% among the 179 patients presented sufficient levels. In the adults group, 95% presented DENV-IgG+ and 59.46% were ZIKV-IgG+ with sufficient vitamin D dosage. In this group, the symptoms of headache and diarrhea were related to patients with ZIKV-IgG+; while paralysis was related to vitamin D levels in ZIKV-IgG+ and rash associated with vitamin D levels in patients ZIKV-IgG+ and CHIKV-IgG+. In mothers and children group, 60.87% of mothers were sufficient for vitamin D, among them 92.86% ZIKV-IgG+. Among children with microcephaly, 57.14% presented satisfactory levels of vitamin D. Although no statistical statistic was found, it was observed that a majority of vitamin D sufficient patients did not present positive serology for arboviruses. The results obtained have great importance for the knowledge about a cause-effect relationship of Arboviruses in the population. Further researches should be performed in a larger cohort to determine the role of vitamin D as immune modulator, including the sufficient rates assumed as adequate, hormonal regulation and enzyme regulation involved in the virus infection.

Key words: Arboviruses. Microcephaly. Vitamin D.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 JUSTIFICATIVA.....	10
3 REFERENCIAL TEÓRICO.....	11
3.1 Epidemiologia das Arboviroses.....	11
3.1.1 Chikungunya vírus.....	13
3.1.1.1 <i>CHIKV</i> e patogênese.....	14
3.1.2 Zika vírus.....	16
3.1.2.1 <i>ZIKV</i> e patogênese.....	17
3.2 Vitamina D.....	21
3.2.1 Metabolismo da vitamina D.....	22
3.2.2 Funções Biológicas da Vitamina D.....	24
3.2.3 Hipovitaminose D.....	26
3.2.4 Efeito Imunomodulador da Vitamina D.....	27
4 OBJETIVOS.....	30
4.1 Objetivo Geral.....	30
4.2 Objetivos Específicos.....	30
5 METODOLOGIA.....	31
5.1 População de estudo.....	31
5.2 Considerações Éticas.....	31
5.3 Obtenção das Amostras.....	32
5.4 Processamento das amostras.....	32
5.5 Dosagem de Vitamina D.....	33
5.6 Análise estatística.....	33
6 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	34
6.1 Análise da concentração de Vitamina D em pacientes adultos com sintomatologia de fase aguda para infecção por arbovírus.....	36
6.2 Análise da concentração de Vitamina D em mães e bebês com microcefalia...	46
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52

1 INTRODUÇÃO

Nos últimos anos, as arboviroses têm sido um motivo de preocupação devido à alta incidência de manifestações clínicas que acometem as pessoas infectadas, tornando um problema grave para a Saúde Pública. O Brasil tem sido alvo de epidemias devido não só às condições climáticas que favorecem a proliferação dos vetores, como também à ausência de vigilância efetiva nas fronteiras, entre outros fatores. Trata-se de área endêmica para o vírus da Dengue, nos últimos dois anos ocorreram epidemias que para a febre pelo Zika vírus (ZIKV) e a febre causada pelo Chikungunya vírus (CHIKV).

Nos casos da febre pelo CHIKV, verifica-se aumento do número de pacientes acometidos pela fase crônica, com intensa artralgia, que parece estar associado a uma maior incidência de formas mais graves da doença com relatos de casos de envolvimento neurológico, hepatite fulminante e encefalopatia neonatal. No Brasil, nos últimos dois anos, milhares de pessoas foram infectadas com arboviroses, ocorrendo desde situações mais graves como a microcefalia nos bebês (com confirmação da infecção pelo ZIKV nas gestantes) e também a alta incidência da síndrome de *Guillain-Barré* em pacientes infectados tanto pelo ZIKV e CHIKV.

Diante do exposto, medidas devem ser tomadas e estudos realizados, principalmente voltados para prevenção das sintomatologias mais graves. O conhecimento das funções da vitamina D, tanto na saúde como na doença, têm aumentado muito nas últimas décadas, pois ela tem sido apontada como um importante regulador de diversas funções no organismo. O conhecimento da sua importância fisiológica aumenta a preocupação sobre os riscos da deficiência da mesma, principalmente nas mães e seus recém-nascidos.

Diversos estudos foram realizados mostrando que níveis suficientes da vitamina D, diminuem significativamente a incidência de doenças virais agudas no trato respiratório (SABETTA et al., 2010), como também promovem condições favoráveis para respostas mais eficientes a algumas infecções virais, como hepatite B e dengue (BELLAMY et al., 1999; LOKE et al., 2002). No entanto, até onde foi possível averiguar não foram encontrados estudos mostrando a correlação entre níveis de vitamina D e infecções pelo arbovírus ZIKV. Este trabalho buscou avaliar a relação entre a dosagem da vitamina D com a presença dos arbovírus ZIKV e CHIKV, bem como a ocorrência das suas sintomatologias.

2 JUSTIFICATIVA

Pesquisas com o CHIKV e ZIKV, até pouco tempo, não estavam em evidência, visto que a infecção em humanos tinha uma baixa escala de epidemia e os prejuízos acarretados por eles eram irrisórios. Logo, pesquisas que nos permitissem compreender de forma aprofundada questões relacionadas a biologia, fisiopatologia, interação vírus-hospedeiro, formas de detecção e de tratamento, eram e continuam sendo, bastante escassas. Nos dias atuais, vimos a disseminação desses vírus de forma gradual, atingindo os cinco continentes que formam o globo. O Brasil vem sendo atingido por surtos destes arbovírus, onde foi observado um quadro crescente de doenças neurológicas, como microcefalia em recém-natos e síndrome de Guillain-Barré, principalmente, em adultos jovens, entre outros sintomas, por isso as infecções pelos vírus ganharam destaques na atualidade.

3 REFERENCIAL TEÓRICO

3.1 Epidemiologia das Arboviroses

As arboviroses são transmitidas por artrópodes (classe *insecta*) e atualmente o que é o mais encontrado como vetor é o *Aedes aegypti*, estima-se que existam cerca de 545 espécies de vírus divididos em 5 famílias de arboviroses. Desses, mais de 150 estão associados com patologias transmitidas aos seres humanos, através das picadas dos insetos hematófagos (LOPES; NOZAWA; LINHARES, 2014). Com isso, o risco de ocorrer epidemias de grande escala, como as pandemias, tem se tornado cada vez mais frequente. No século XXI alguns eventos potenciaram a atenção dos pesquisadores quanto aos riscos e impactos de epidemias com alto potencial viral como: gripe aviária, gripe suína, vírus Influenza A (H1N1), ebola e mais recentemente os arbovírus zika vírus (ZIKV) e chikungunya vírus (CHIKV) (VIASUS; DE LA HOZ, 2015).

Os vetores das arboviroses no Brasil estão presentes em larga escala, e estão disseminados por todo território nacional, pois eles são de região tropical e subtropical e são vetores que já propagam outras arboviroses, como é o caso da dengue (SIMON, 2008). Enquanto o mosquito transmissor do CHIKV, *Aedes aegypti*, exibe um comportamento urbano, sendo encontrado principalmente em locais com aglomeração humana no qual se alimenta de sangue, o *Aedes albopictus* apresenta comportamento alimentar diversificado e é mais comum em áreas com menor densidade humana (HONÓRIO et al., 2009).

Desde junho de 2014, foram notificados casos importados no Brasil. Em setembro de 2014, a transmissão local do genótipo asiático de CHIKV, que circulava no Caribe, foi confirmada no Amapá (Norte do Brasil). Uma semana mais tarde, o genótipo ECSA, anteriormente não detectado nas Américas, surgiu no estado da Bahia, no Nordeste do Brasil. Desde então, mais de 25 mil casos suspeitos de CHIKV foram registrados no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2016).

O primeiro surto de chikungunya documentado ocorreu no ano de 1952, no Sul da Tanzânia, quando ocorreu sua introdução no Sudeste Asiático e na Índia, circulando em um ciclo urbano esporádico que ainda continua até hoje, com *Ae. Aegypti* atuando como o principal vetor. Durante a última década o ciclo de transmissão epidêmica de CHIKV causou grandes surtos em toda a Ásia, África e as ilhas no Oceano Índico (GALLIAN et al., 20017). Com três genótipos diferentes: África Ocidental, Leste/Central/Sul Africano (ECSA) e Ásia. (NASCI,

2014). A proporção dos casos crônicos variou em diferentes epidemias na França, África do Sul e ilhas no Oceano Índico, de 4% para 63%. Embora as condições graves não sejam comuns e não ocorram choque ou hemorragia grave como na dengue, manifestações neurológicas (encefalite, meningoencefalite, mielite, síndrome de *Guillain Barré*), pele bolhosa e miocardite podem trazer gravidade para casos, especialmente em lactentes e idosos (POWERS; LOGUE, 2007).

O primeiro caso CHIKV autóctone (humano-para-mosquito-para-humano) nas Américas ocorreu na Ilha de São Martinho (Caribe) no final do ano de 2013 (CDC 2014). Após este acontecimento, a presença de vetores transmissores e a intensa circulação de pessoas, levaram ao surgimento de casos autóctones nos países da América do Sul, além da Argentina, Chile e Uruguai (CARBAJO; VEZZANI, 2015; OPAS/OMS, 2015). O CHIKV embora seja de origem africana, atualmente tem sido relatado em vários países como: Tailândia, Indonésia, Cingapura, Malásia, Ilhas Maldivas, Quênia, Itália, Índia, Guiana Francesa e Estados Unidos (UJVARI, 2014).

No final de fevereiro de 2015, o Ministério da Saúde (Secretaria de Vigilância – SVS/MS) começou a monitorar o número cada vez maior de uma doença exantemática no Nordeste do Brasil. Em março do mesmo ano, o Ministério da Saúde começou a investigar a fonte dos surtos e se os sintomas relatados eram causados por dengue, rubéola, ou febre Chikungunya. Os resultados preliminares excluíram a infecção por estes agentes patogênicos e, mais tarde, naquele mês, o ZIKV foi isolado em Natal (SLAVOV, 2016).

Devido às condições ambientais do território do Brasil (clima tropical e zonas climáticas diferentes) que favorecem a proliferação do vetor, o *Ae. aegypti*, as populações urbanas brasileiras têm enfrentado grandes surtos urbanos de dengue e febre Chikungunya que são importantes problemas de saúde pública no país. O mecanismo de transmissão mais comum do ZIKV é vetorial, através do mosquito do gênero *Aedes*, principalmente, pelo *Ae. aegypti*. A fêmea do *Aedes* ao realizar hematofagia, introduz o vírus na pele humana, seguida pela infecção de células permissivas (BRIANT et al., 2014). No entanto, alguns estudos têm confirmado a existência de outros tipos de transmissões. As transmissões não vetoriais são consideradas as principais responsáveis pela disseminação da doença em áreas não endêmicas. O ZIKV também pode ser difundido pela transmissão sexual, fluídos genitais, verticalmente (BESNARD et al., 2014; MUSSO et al., 2016; ATKINSON et al., 2016; MLAKAR et al., 2016).

3.1.1 Chikungunya vírus

O vírus RNA (ácido ribonucléico) da chikungunya (CHIKV) pode ser transmitido pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, e foi identificado pela primeira vez na Tanzânia no início da década de 1950. O nome "chikungunya" é derivado da língua Makonde falada em partes da África Oriental, que significa "o que se curva" e refere-se à postura de flexão apresentada pelos indivíduos infectados com o vírus, pois sofrem de intensa artralgia (ROBINSON, 1955).

O CHIKV infecta os seres humanos através de um "ciclo zoonótico" (a partir de um reservatório de primatas não humanos e mosquitos silvestres). Estudos realizados para verificar o potencial de transmissão vertical da infecção pelo CHIKV, foram realizados inoculando subcutaneamente nos primatas genótipo da linhagem ECSA ou da linhagem asiática. No entanto, observou-se que não há transmissão vertical do vírus, sugerindo que nos casos em que os recém-nascidos nascem de mães com viremia, é provável que a transmissão de chikungunya de mãe para filho ocorra durante o parto e não verticalmente no útero (CHEN et al., 2010).

A infecção pelo CHIKV tem período de incubação que varia de 3 a 7 dias, enquanto que o período da viremia não é maior do que 8 dias. O índice de letalidade é menor do que 1%, entretanto, a apreensão mundial concentra-se no modo como a doença se manifesta (SCANDAR, 2012). A sintomatologia é caracterizada por febre associada com dor articular grave e debilitante, cefaléia e mialgia. Embora tenha sintomas semelhantes à dengue, chama a atenção para a poliartrite (principalmente pulsos, tornozelos e cotovelos), que geralmente melhora após 10 dias, porém pode durar meses após a febre (POWERS; LOGUE, 2007). No entanto, já foram notificadas formas graves de infecção, como as síndromes encefalíticas em recém-nascidos, que ocorreram após infecção tardia da mãe durante a gravidez. Além disso, sequelas artríticas persistentes que debilitam, são observados em uma proporção de pacientes (THIBERVILLE et al., 2013).

A frequência dos surtos nos últimos 15 anos aumentou e parece estar associado a uma maior incidência de formas mais graves da doença, com relatos de casos de envolvimento neurológico, hepatite fulminante e encefalopatia neonatal (JOUBERT et al., 1985; WIELANEK et al., 2006). A infecção pelo vírus chikungunya pode apresentar também manifestações atípicas (Quadro 1).

Quadro 1 - Manifestações atípicas da infecção pelo vírus Chikungunya.

Sistema	Manifestações Clínicas
Neurológico	Meningoencefalite, encefalopatia, convulsões, síndrome de Guillain-Barré, síndrome cerebelar, paresia, paralisia, neuropatia
Ocular	Neurite óptica, iridociclite, episclerite, retinite, uveíte
Cardiovascular	Miocardite, pericardite, insuficiência cardíaca, arritmias, instabilidade hemodinâmica
Dermatológico	Hiperpigmentação fotossensível, úlcera aftosa intertriginosa, dermatose vesículo-bolhosa
Renal	Nefrite, insuficiência renal aguda
Outros	Discrasias hemorrágicas, pneumonia, insuficiência respiratória, hepatite, pancreatite, SSIHA, hipoadrenalismo

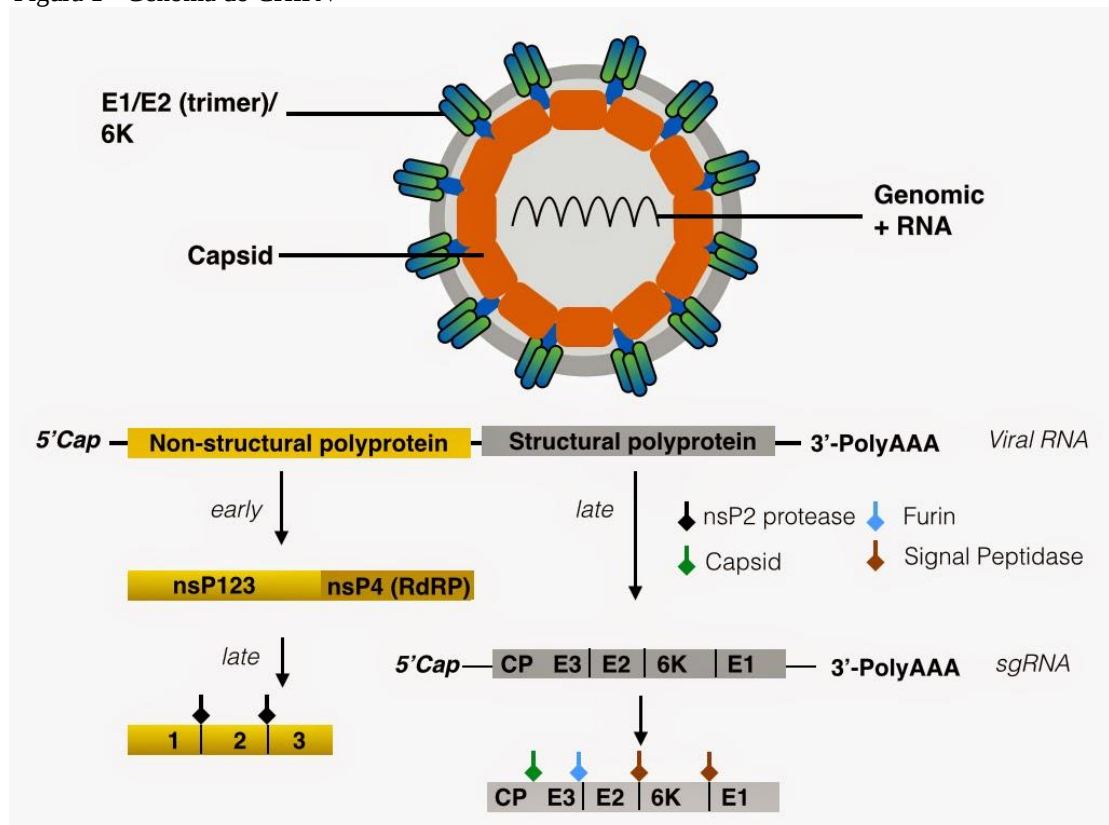
Fonte: Manual Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

A remissão da doença nos indivíduos infectados não tem tempo determinado, podendo persistir por meses ou anos, ocasionando sinais crônicos da patologia e incapacitando os infectados de realizar até mesmo suas tarefas rotineiras. A cura para essa doença vai depender diretamente do estado imunológico do indivíduo, e rotineiramente os medicamentos utilizados são apenas para diminuir os problemas relacionados com sintomas secundários (DUPUI-MAGUIRAGA, 2012).

3.1.1.1 CHIKV e patogênese

O CHIKV faz parte da família *Togaviridae* e do gênero *Alphavirus*, sendo um vírus envelopado e com material genético constituído por RNA de fita simples positiva, que codifica quatro proteínas não estruturais que participam da replicação viral (NS1, NS2, NS3 e NS4). Também possui três proteínas estruturais que são: a que forma o capsídeo (C) e duas que constituem o envelope (E1 e E2) (PARDIGON, 2008) (Figura 1).

Figura 1 - Genoma do CHIKV



Fonte: <http://virologytidbits.blogspot.com.br/2014/08/chikungunya-virus-and-ndp52-deadly.html>

A fisiopatologia da chikungunya ainda é pouco compreendida, envolvendo mecanismos predominantemente periféricos, onde a fase aguda está associada com a viremia, consequentemente os sintomas clínicos refletem a carga viral e o início da imunidade inata, relacionando-se com elevado nível de citocinas pró-inflamatórias (CHOW et al., 2011). No período da fase aguda da infecção, são encontrados altos títulos do CHIKV no sangue, resultando em viremia que pode ser detectada pela reação em cadeia de polimerase em tempo real (RT-PCR) durante os primeiros dias da infecção. Na resposta inflamatória resultante, observa-se a elevação de mediadores imunológicos, seguida pela infiltração de células imunes em articulações infectadas e tecidos circundantes. Os pacientes com infecção aguda e crônica do vírus chikungunya têm altas concentrações de citocinas circulantes e quimiocinas, tais como: interferon- α (INF- α), INF- γ , interleucina (IL) 6, IL-4 e IL-10, IP-10 e proteína quimiotática de monócitos 1 (CHIRATHAWORN et al., 2013; REDDY et al., 2014; TENG et al., 2015).

Pacientes infectados com chikungunya desenvolvem uma resposta imunológica através de anticorpos, com concentrações de IgM detectáveis no início da infecção e IgG neutralizante anti-chikungunya mensuráveis, na segunda semana de infecção. Esses anticorpos são importantes para a depuração do vírus infeccioso (SEYMOUR et al., 2015). A IgG anti-

chikungunya persiste durante pelo menos 21 meses, e provavelmente por anos, resultando assim, em uma imunidade antiviral que previne os sintomas clínicos no caso de uma segunda infecção com esse vírus (KAM et al., 2012). Um número maior de células natural killer (NK) foram encontradas no sangue periférico de pacientes com artrite persistente induzidos pelo chikungunya, comparado com controles saudáveis (MINER et al., 2015).

Estudos têm-se centrado na resposta imune inata durante a infecção aguda do CHIKV. O fato de alguns pacientes desenvolverem a artrite persistente não está claro, e as vias imunes que controlam ou desencadeiam esses sintomas crônicos ainda permanecem indefinidas, três hipóteses foram apresentadas para explicar o porquê dos pacientes frequentemente desenvolvem artrite crônica: (1) persistência do vírus infeccioso; (2) persistência de ácidos nucleicos virais, o que poderia desencadear imunopatologia persistente; (3) desencadeamento de ativação imune persistente em certos indivíduos após o vírus infeccioso ter sido eliminado. Apesar de que nenhuma dessas hipóteses tenha sido comprovada, estudos clínicos em modelos animais têm produzido resultados intrigantes, como quando as proteínas virais foram detectadas nos macrófagos, em macacos infectados com chikungunya muito tempo após a infecção aguda, sugerindo a persistência do vírus infeccioso (LABADIE et al., 2010)

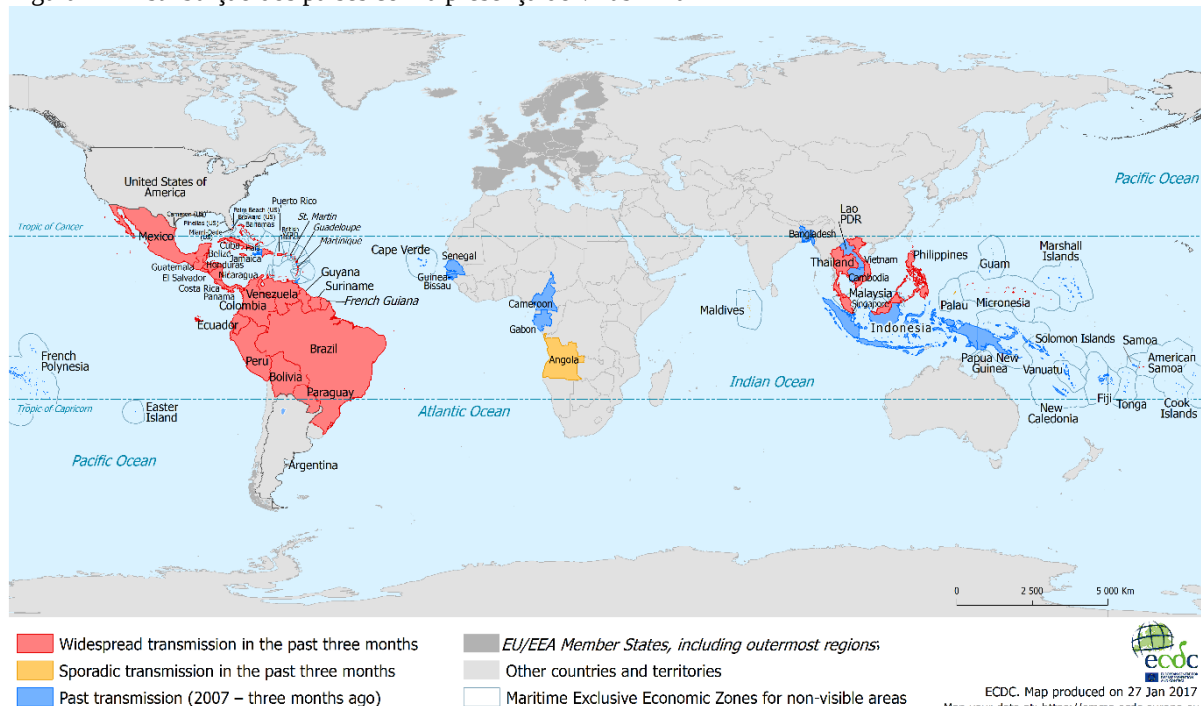
3.1.2 Zika vírus

O vírus Zika (ZIKV) é um membro da família *Flaviviridae* e foi isolado pela primeira vez em 1947 durante um estudo feito com macaco *Rhesus*, na Floresta Zika da Uganda (SIMPSON, 1964). Alguns anos mais tarde, em 1952, na África Oriental houve o primeiro relato de infecção pelo vírus Zika em humanos (DICK et al., 1952; SMITHBURN, 1954). Nessa época, se pensava que o vírus ocasionava infecções leves, no entanto, em 2007 e 2013 surtos (com relatos de complicações neurológicas) ocorreram na Micronésia e Polinésia Francesa, respectivamente e os conceitos prévios sobre essa infecção mudou radicalmente (HADDOW, et al., 2012; OEHLER et al., 2014).

O ZIKV, atualmente, tem apresentado um surto histórico com grande disseminação mundial (Figura 2), estando presente em mais de 70 países, principalmente, naqueles que formam as Américas Central e do Sul (EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, 2016). O número de infectados pelo Zika vêm aumentando rapidamente nas Américas devido ao surto proveniente do Brasil, considerado o primeiro país entre as Américas a detectar o vírus, em março de 2015. Logo depois, o país apresentou um surto epidêmico, com

uma estimativa de 1.300.000 casos suspeitos até março de 2016 (ZANLUCA et al., 2015; HENNERREY et al., 2016; BOGOCH et al., 2016).

Figura 2 - Distribuição dos países com a presença do vírus Zika



Fonte: ECDC (2017).

3.1.2.1 ZIKV e patogênese

A transmissão do ZIKV se dá pela competência vetorial da picada de mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*), que encontram-se amplamente distribuídos em zonas tropicais, subtropicais e temperadas, abrangendo um enorme contingente de pessoas suscetíveis (BOORMAN; PORTERFIELD, 1956; GRARD et al., 2014).

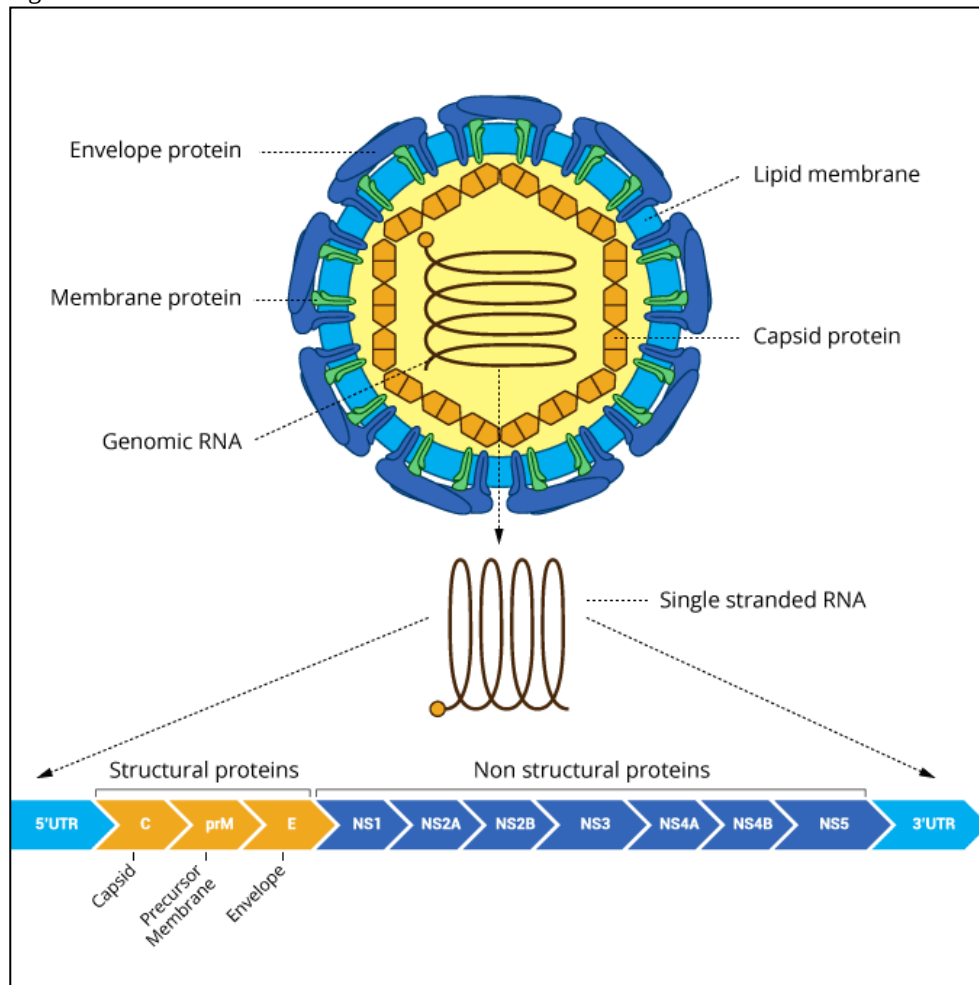
O vírus Zika tem o ácido ribonucleico (RNA) como seu material genético e pertence ao gênero Flavivírus, família *Flaviviridae*. O genoma é constituído por uma molécula de RNA, de cadeia simples e sentido positivo, onde alguns estudos relatam três linhagens principais: uma original da Ásia e duas da África. A linhagem asiática foi a responsável pelos casos de transmissão autóctone deste vírus, recentemente ocorridos no Brasil (ZANLUCA et al., 2015). O ZIKV é transmitido principalmente pelos mosquitos *Aedes aegypti* e *Aedes albopictus*, havendo também a possibilidade de transmissão pela via sexual, transfusão sanguínea e

perinatal; embora ainda não se saiba como realmente essas vias de transmissão ocorrem na propagação da infecção (LUZ; SANTOS; VIEIRA, 2015).

O vírus do ZIKV parece limitado por um invólucro lipídico derivado do retículo endoplasmático das células onde eles se replicam, invólucro esse que limita um capsídeo nuclear com estrutura e simetria ainda não definidas, composta pela proteína C e pelo genoma viral (Figura 3). O invólucro viral contém duas proteínas de superfície (M e E), e adicionalmente o genoma viral codifica outras proteínas não-estruturais que, ou possuem atividade enzimática (NS3: helicase de RNA e protease e NS5: polimerase de RNA, dependente de RNA), ou desempenham funções regulatórias (controle de replicação, transcrição, tradução e resposta imune) durante a replicação intracelular (KUNO; CHANG, 2007; HADDOW et al., 2012)

Na maioria dos casos, a infecção pelo ZIKV não apresenta sintomas, no entanto, pode provocar alguns sinais como febre, cefaleia, erupções cutâneas acompanhadas de prurido, artralgia e conjuntivite não purulenta. Tendo um período de incubação de aproximadamente 10 dias, com os sintomas sendo apresentados durante 7 dias. Juntamente a esses sintomas, a infecção pelo ZIKV vem sendo relacionada com alterações neurológicas, sendo a microcefalia e a síndrome de *Guillain-Barré* as mais evidentes (ANGELETTI et al., 2016).

Figura 3 - Genoma do ZIKV



Fonte: <https://www.promega.com.br/resources/pubhub/inspiration/zika-perspectives-responses/>

Em crianças o quadro cutâneo pode ser atípico devido a lesões maculares com tendência à confluência, lesões vesiculares e até mesmo tendência à recorrência sob determinados fatores precipitantes, como o estresse. Em imunossuprimidos pode ocorrer quadros com complicações viscerais graves, prolongados ou fatais, como ocorre em outras infecções virais nesse segmento da população (ZANLUCA et al., 2015) (Tabela 1).

Tabela 1 - Manifestações clínicas mais frequentes provocadas por vírus dengue, chikungunya e Zika.

Sintomas	Dengue	Chikungunya	Zika
Febre (intensidade)	+++	++	+
Mialgia	+++	++	+
Exantema	+	++	+++
Artralgia	+/-	+++	+
Cefaleia	+++	+	+
Conjuntivite	-	++	+++
Discrasia	++	+/-	-
Choque	+++	+/-	-
Plaquetopenia	+++	+/-	+/-
Neutropenia	++	+	SI
Leucopenia	++	+++	SI

Fonte: Adaptado do Manual de Manejo Clínico do Chikungunya (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2014).

O diagnóstico da infecção aguda do ZIKV pode ser realizado por meio da amplificação por reação em cadeia da polimerase, antecedida de transcrição reversa (RT-PCR), a partir do RNA extraído diretamente do soro do paciente, preferencialmente coletado até o sexto dia da doença (FAYE et al., 2008). O vírus também pode ser detectado por meio de técnicas moleculares aplicadas em outros fluídos corporais como a saliva e a urina (MUSSO et al., 2015; GOURINAT et al., 2015). Anticorpos IgM podem ser encontrados à partir do terceiro dia da doença e anticorpos IgG devem ser pesquisados no soro na fase aguda e convalescente (LANCIOTTI et al., 2008). Algumas alterações em exames laboratoriais, como leucopenia, trombocitopenia e mudanças nos níveis de alanina aminotransferase (TGP) e aspartato aminotransferase (TGO) (ZANLUCA et al., 2015; TAPPE et al., 2016).

Dentre as várias funções encontradas para a vitamina D está a de modulador do sistema imune, onde em suma, a mesma polariza a resposta imune para o tipo Th2, em detrimento da resposta Th1 (YOUNG; Jr, UUNDERDAHL; CARPENTER, 1949). Estudos mostram que a

resposta celular do tipo Th1 promove uma depuração mais eficiente em infecções virais, incluindo arboviroses como é o caso da dengue (LOKE et al., 2002).

3.2 Vitamina D

Vitaminas são formadas por compostos orgânicos, que são essenciais para o metabolismo dos seres vivos. A vitamina D é um hormônio secosteróide lipossolúvel que tem funções endócrinas e autócrinas (VANCHINATHAN; LIM, 2012). Existem várias formas de vitamina D, as mais conhecidas são o ergocalciferol ou vitamina D2 (presente nas plantas) e o colecalciferol ou vitamina D3, obtida fotoquimicamente mediante a ação da luz solar (radiações ultra-violetas) a partir do precursor 7-deidrocolesterol, que é sintetizado na pele (KULIE et al., 2009). Tanto a vitamina D2 como a D3, são metabolizadas pela mesma via e produzem metabólitos ativos com efeitos fisiológicos equivalentes (OLIVEIRA; LEMOS, 2010).

Os conhecimentos das funções da vitamina D tanto na saúde como na doença, têm aumentado muito na última década, além da tradicional função na homeostase do cálcio e fósforo e saúde músculo-esquelética, nosso entendimento aumentou rapidamente nos últimos 10 anos no que diz respeito à variedade funcional dessa vitamina em outros sistemas e patologias. Além de sua importância na regulação da fisiologia osteomineral, especialmente no metabolismo do cálcio, a $1,25\text{ (OH)}^2\text{D}$ também está envolvida na homeostase de diversos processos celulares, como a síntese dos antibióticos naturais pelas células de defesa dos mamíferos (HEWISON, 2010); modulação da autoimunidade e na síntese das interleucinas inflamatórias (CANTORNA; MAHON, 2005); papel anti-oncogênico através da regulação nos processos de multiplicação e diferenciação celular (DEEB et al., 2007), e também no controle da pressão arterial (LI et al., 2004).

A vitamina D é considerada um micronutriente essencial apenas em condições de baixa exposição à luz solar, pois pode ser obtida pela síntese cutânea na presença de luz ultravioleta, quando o composto 7-deidrocolesterol passa a colecalciferol (D3) (STAMP, 1974). A vitamina D pode estar presente em alguns alimentos e suplementos alimentares, entretanto apenas cerca de 20% das necessidades corporais diárias são supridas pela alimentação, fato que diferencia a vitamina D das demais vitaminas (HUOTARI; HERZIG, 2008).

As principais fontes através da alimentação, apenas 10% a 20% da vitamina D necessária, são a vitamina D3 (colecalciferol, de origem animal, que também está presente nos peixes gordurosos de água fria e profunda, como o atum e o salmão) e a vitamina D2 (ergosterol,

de origem vegetal, que encontra-se presente nos fungos comestíveis). Os restantes 80% a 90% são sintetizados endogenamente (HOLICK, 2008). A vitamina D tanto obtida através da dieta ou por ativação do 7-deidrocolesterol, é encontrada na forma inativa, e deve ser ativada para exercer as suas atividades biológicas.

3.2.1 Metabolismo da vitamina D

A vitamina D₂ é uma molécula composta por 28 carbonos e pode ser sintetizada através da irradiação UVB do ergosterol encontrado em fungos, enquanto que a vitamina D₃ apresenta 27 carbonos e pode ser obtida através da irradiação UVB do 7-deidrocolesterol proveniente da lanolina (HOLICK, 2007).

A pele é o único local do corpo humano capaz de produzir vitamina D. A própria vitamina D ou 7-deidrocolesterol é sintetizada tanto pela derme quanto pela epiderme (PREMAOR; FURLANETTO, 2006). A luz ultravioleta situada entre 290 nm e 315 nm (UVB), conjuga duplas pontes de hidrogênio nos carbonos C₅ e C₇, sintetizando assim, a pré-vitamina D. Uma vez sintetizada, a pré-vitamina D forma homodímeros em aproximadamente 24 horas, transformando-se em vitamina D. Como este processo ocorre principalmente próximo ao leito capilar, o mesmo não é influenciado por alterações de temperatura externas ao corpo humano (HOLICK, 1995).

Todos os derivados do colecalciferol são lipossolúveis e circulam principalmente ligados a uma globulina denominada Proteína Ligadora da Vitamina D (DBP), cuja função é o transporte dessas moléculas hidrofóbicas a vários órgãos-alvo (HOLICK, 1995; LEVINE, 2003). No entanto, a vitamina D também pode circular ligada à albumina (VERBOVEN, 2002).

Uma vez ingerida, a vitamina D é absorvida no intestino delgado e incorporada a quilomicrons para ser levada ao fígado. A partir desse momento, o metabolismo torna-se igual ao da vitamina D sintetizada pela pele, sendo aproximadamente, 75% da vitamina D circulante convertida a 25(OH)D em sua primeira passagem pelo fígado pela hidroxilação no carbono 25 (HOLICK, 1995).

Essa hidroxilação é mediada por uma enzima microsomal D₃-25-hidroxilase (25-OHase) da superfamília do citocromo P450 (CYP450) denominada CYP2R1, dando origem a 25-hidroxivitamina D ou calcidiol (25(OH)D₃ e 25(OH)D₂). Após esta etapa de hidroxilação este composto é transportado para os rins, onde é produzida a 1,25(OH)²D, que é sua forma ativa. A CYP2R1 é uma enzima expressa preferencialmente no presente no retículo

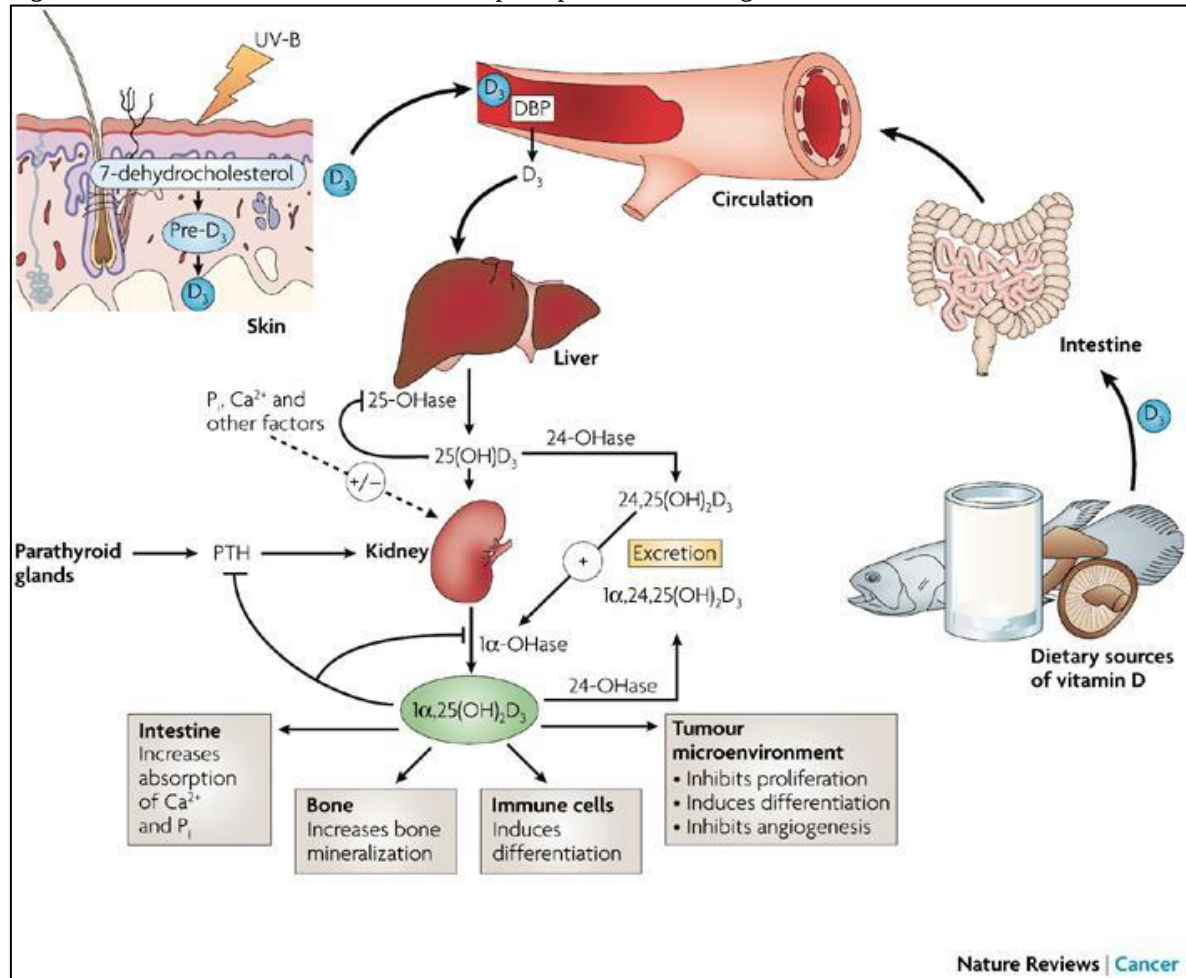
endoplasmático das células hepáticas, mas também presente nas células testiculares (PROSSER; JONES, 2004; BLOMBERG et al., 2010; THORNE-LYMAN; FAWZI, 2012). No entanto, essa reação pode ocorrer em outros tecidos incluindo pele, intestino e rim (FRASER; KODICEK, 1970).

Nos rins, mais precisamente nas mitocôndrias dos túbulos contorcidos proximais, encontra-se presente a enzima 1α -hidroxilase, conhecida como CYP27B1 (*cytochrome p450 27B1 enzyme*, uma enzima que é codificada pelo gene CYP27B1, catalisadora da hidroxilação de calcidiol para a forma bioativa da vitamina D), que é uma ferredoxina renal e faz parte do citocromo P450 (OMDAHL et al., 2001). Esta enzima tem como função converter a 25(OH)D em $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ ou calcitriol, a forma mais ativa deste hormônio (HAUSSLER; MCCAIN, 1977). A CYP27B1 é expressa nas células dos túbulos renais proximais, onde a grande parte do calcitriol necessário ao metabolismo sistêmico é sintetizado (NORMAN, 2008). A CYP27B1 também encontra-se presente em outros tecidos, entre eles estão as células da próstata, da mama, do cólon e células do sistema imune, células beta-pancreáticas, paratireoides, placenta, cérebro, células endoteliais e queratinócitos. Nos rins, a expressão do gene CYP27B1 é regulada principalmente pelos níveis séricos do paratormônio (PTH), fósforo, fator de crescimento do fibroblasto 23 (FGF-23) e pela proteína Klotho, sendo estimulada pelo primeiro e suprimida pelos demais (WÖHRLE et al., 2011). Entretanto, nos outros tecidos, a $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ exerce funções parácrinas e autócrinas, nesses casos a regulação da CYP27B1 é PTH independente, ficando regulada principalmente por citocinas e fatores locais específicos de cada célula, como interferon gama e interleucina 1 (HEWISON, 2010).

Aparentemente a vitamina D também gera aproximadamente 20 a 25 metabólitos. Fora a $1,25(\text{OH})^2\text{D}$, onde os mais importantes seriam 24R,25-dihidroxivitamina D; 24,25-hidroxivitamina D e 24S,25-dihidroxivitamina D, os mesmos também são formados no rim, só que pela enzima 25-hidroxivitamina D-24-hidroxilase. Esses metabólitos ainda não possuem a ação biológica bem definida, porém podem corresponder à forma inativa da 25(OH)D (NORMAN, 2001; VAN LEEUWEN et al., 2001; HENRY, 2001).

Estudos demonstraram que o rim não é único órgão com capacidade de converter 25(OH)D em $1,25(\text{OH})^2\text{D}$. Numerosas células e tecidos expressam a 1α -hidroxilase *in vitro*; nos seres humanos, essas fontes extra renais só contribuem significativamente para a circulação dos níveis de $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ durante a gravidez, na insuficiência renal crônica e em patologias como: sarcoidose, tuberculose, doenças granulomatosas e artrite reumatoide (VALDIVIELSO; FERNANDEZ, 2006) (Figura 4).

Figura 4 - Metabolismo da vitamina D e seus principais efeitos biológicos



Fonte: DEEB et al. (2007).

A $25(\text{OH})\text{D}$ mantém níveis constantes e sua dosagem no soro é bastante fidedigna do pool de vitamina D. A sua meia vida é de aproximadamente duas a três semanas. Já a $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ é influenciada por mecanismos de retro-alimentação, com níveis séricos variados e sua meia-vida é de aproximadamente 6 horas (HOLICK, 1995). Nesse contexto, o nível sérico da $25(\text{OH})\text{D}$ é considerado o melhor analito para determinar o estado da vitamina D (CAVALIER et al., 2009).

3.2.2 Funções Biológicas da Vitamina D

A vitamina D tem sido apontada como um importante regulador de diversas funções no organismo, o conhecimento da sua importância fisiológica aumenta a preocupação sobre os riscos da deficiência da mesma, principalmente nas mães e seus recém-nascidos. A função clássica da vitamina D está relacionada com a regulação da homeostase do cálcio, quando

estimula o transporte ativo de cálcio do duodeno para corrente circulatória e aumentando a absorção de fósforo. Na manutenção da massa óssea, essa vitamina atua ocasionando a mineralização normal do osso e atuando tanto na maturação do colágeno, como da matriz extracelular (OMDAHL et al., 2001). Sua ação juntamente com a do paratormônio (PTH), promove ativação e maturação, resultando assim, a mobilização de cálcio dos ossos para corrente sanguínea, e nos rins é responsável por ajudar na reabsorção de cálcio e classificando os indivíduos como: deficientes, insuficientes ou suficientes em vitamina D (NORMAN; BOUILLON, 2010; HOLICK et al., 2011).

Segundo a Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM), concentrações acima de 30 ng/mL de 25(OH)D são desejáveis e devem ser as metas para populações de maior risco, porque acima dessas concentrações, os benefícios da vitamina D são mais evidentes, especialmente no que se refere a doenças osteometabólicas (MAEDA et al., 2014), mas também para a correção do hiperparatireoidismo secundário, juntamente com a redução do risco de quedas e fraturas e a máxima absorção de cálcio (DAWSONHUGHES et al., 2005; NORMAN; BOUILLON, 2010; HOLICK et al., 2011). Dessa maneira, concentrações séricas abaixo de 20 ng/mL (50 nmol/L) são classificadas como deficiência, entre 20 e 29 ng/mL (50 e 74 nmol/L) como insuficiência e entre 30 e 100 ng/mL (75 e 250 nmol/L) como suficiência. Níveis altos do PTH, provocam um aumento da reabsorção óssea liberando cálcio para a corrente sanguínea para manter a homeostase do cálcio, condição conhecida como hiperparatireoidismo secundário (PETERS; MARTINI, 2014).

Concentrações séricas de 25(OH)D abaixo de 30 ng/mL (75 nmol/L) são consideradas por muitos estudiosos como hipovitaminose D (HOLICK, 2007; VIETH et al., 2007), sendo reconhecido pelas diretrizes da *Endocrine Society* (HOLICK et al., 2011). A deficiência e/ou insuficiência da vitamina D é comum em todas as faixas de idade, nas diferentes raças e na população de países mesmo com diferentes latitudes, apesar disso existem fatores de risco para a hipovitaminose, tais como: a presença de doenças ósseas, renais ou gastrintestinais, e também o uso de determinadas medicações, entre outras situações clínicas (PREMAOR; FURLANETTO, 2006).

Dados clínicos emergentes sugerem que a vitamina D pode desempenhar um papel efetivo na resposta imune, cardiovascular, fisiologia renal e proteção contra alguns cânceres (GARG et al., 2012). A vitamina D também desempenha funções em uma variedade de ações biológicas além da homeostase do cálcio, fósforo e manutenção da massa óssea, como a proliferação e diferenciação celular e propriedades imunorregulatórias (HAYES et al., 2003).

Além disso, a vitamina D pode ter funções anti-inflamatórias, como a redução de citocinas produzidas pelas células T e da produção de imunoglobulinas pelas células B (DANIEL et al., 2005).

Por outro lado, as ações da vitamina D na fisiologia sistêmica podem ser evidenciadas a partir dos estudos moleculares de microarranjos (*microarrays*) e também a análise *in silico*, os quais mostram que a $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ tem efeito regulatório em mais de 900 genes-alvos potenciais, correspondendo a cerca de 3% do genoma humano (WANG et al., 2005).

3.2.3 Hipovitaminose D

A hipovitaminose D constitui um problema de saúde pública no Brasil, onde pode exceder mais de 90% dos indivíduos, dependendo da população estudada (MITHAL et al., 2009). Para o diagnóstico da hipovitaminose D, há o consenso de que a $25(\text{OH})\text{D}$ ou calcidiol é o metabólito mais abundante e o que melhor indica a avaliação do *status* de vitamina D.

Os grupos mais estudados em relação à hipovitaminose D são os idosos e as gestantes, com uma prevalência de 20 a 100%, dependendo da população avaliada. Esses estudos decorrem de vários fatores, dentre os quais o fato de que poucos alimentos contêm quantidades significativas desta vitamina, como também a recomendação de evitar a exposição ao sol e/ou uso de bloqueadores solares, que impede a transformação na pele de pró-vitamina D em vitamina D3 (HOLICK et al., 2011; SCHLEICHER et al., 2011) (Quadro 2).

Quadro 2 - Fatores de risco e causas associados à hipovitaminose D.

Fatores	Causas
Pouca exposição à luz UVB	Uso excessivo de roupas Países de pouca insolação (alta latitude) Pouca penetração da luz UVB durante o inverno na atmosfera Uso de bloqueadores solares Confinamento em locais onde não há exposição à luz UVB
Diminuição da capacidade de sintetizar vitamina D pela pele	Envelhecimento Fotótipo Raça amarela
Doenças que alteram o metabolismo da 25-hidroxivitamina D ou 1,25-dihidroxivitamina D	Fibrose cística Doenças do trato gastrointestinal Doenças hematológicas Doenças renais Insuficiência cardíaca Imobilização

Fonte: Premaor e Furlanetto (2006).

Estudos ecológicos envolvendo a relação entre luz do sol ou latitude, relacionam os níveis da vitamina D, conhecida por modular a auto-imunidade, com a aparição de doenças. Pesquisas observacionais têm demonstrado sua importância em várias doenças, como esclerose múltipla (SMOLDERS et al., 2008) ou artrite reumatóide (MERLINO et al., 2004).

3.2.4 Efeito Imunomodulador da Vitamina D

Finsen recebeu no ano de 1903 o prêmio Nobel de Fisiologia ou Medicina por demonstrar que a exposição do sol era benéfica para os pacientes que apresentavam *lupus vulgaris*. Durante décadas sabia-se que a exposição ao sol era benéfica aos pacientes com tuberculose. Esse fato foi explicado mais tarde, com o papel da catelicidina, um peptídeo produzido pelos monócitos e macrófagos, que apresentam na sua superfície dos receptores *Toll-like*, estes desencadeiam atividade antimicrobiana direta contra bactérias intracelulares. A ativação destes receptores aumenta a expressão do receptor de vitamina D e dos genes da 25(OH)1 α -hidroxilase. Isto conduz à indução do peptídeo antimicrobiano catelicidina a eliminar o *Mycobacterium tuberculosis* intracelular. A produção de catelicidina para quando os níveis extracelulares de 25(OH)D estão abaixo de 20 ng/mL (LIU et al., 2006).

O papel fisiológico da vitamina D no sistema imune ainda não está completamente esclarecido. Animais e seres humanos com deficiência de vitamina D têm um risco aumentado para infecções, possivelmente devido a função macrofágica deficiente (SILVA et al., 1993). A

produção ectópica de $1,25(\text{OH})^2\text{D}_3$ por macrófagos e monócitos ativados em doenças granulomatosas, bem como a presença dos receptores de vitamina D (VDR) em células e tecidos não relacionados ao metabolismo e a homeostase óssea, além da diminuição da atividade antimicrobiana em macrófagos e monócitos observada em indivíduos com raquitismo, chamou atenção para o papel da vitamina D no sistema imunológico (BERTOLINE; TZANNO-MARTINS, 2000).

No sistema imunológico, a $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ apresenta importante papel imunorregulatório autócrino em várias células: CD4^+ , CD8^+ , linfócitos T e células apresentadoras de antígenos. Onde participa da regulação da diferenciação das células precursoras em células mais especializadas do sistema monocítico-macrofágico e no estímulo à expressão dos genes que codificam a catelicidina e a α e β -defensinas, antimicrobianos sintetizados pelas células do sistema imune de mamíferos (HEWISON, 2010). Paradoxalmente esse efeito estimulador da defesa imunológica inespecífica, contrasta com a inibição do sistema imune antígeno-específico, a função monocítica como célula apresentadora de antígeno parece diminuir, levando a diminuição da expressão de antígenos HLA classe II e a inibição da produção de IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (XU et al., 1993).

A $1,25(\text{OH})^2\text{D}$ também atua na modulação da autoimunidade, mantendo equilíbrio entre as respostas Th1 (celular) e Th2 (humoral). Em situações onde são encontradas baixas concentrações de $25(\text{OH})\text{D}$, o sistema imunológico predispõe o desenvolvimento de células T autorreativas, que são direcionadas contra tecidos do próprio organismo e favorece também a síntese de interleucinas pró-inflamatórias (IL-12, interferon gama), predispondo-o a um risco aumentado de desenvolver doenças autoimunes, como: diabetes melito tipo 1, artrite reumatoide, esclerose múltipla e doenças inflamatórias intestinais (HEWISON, 2010).

A vitamina D pode interagir com o sistema imunológico através de sua ação sobre a regulação e a diferenciação de células como linfócitos, macrofágos, e células NK, além de interferir na produção de citocinas *in vivo* e *in vitro*. Destacam-se entre os modelos imunomoduladores demonstrados: diminuição da produção da interleucina 2 (IL-2), do interferon gama ($\text{INF}\gamma$) e do fator de necrose tumoral (TNF); a inibição da expressão da interleucina 6 (IL-6); e as inibições da secreção e produção de auto-anticorpos pelos linfócitos B (MARQUES et al., 2010). Menores níveis de citocinas circulantes levam a menor apresentação de antígenos pelas células dendríticas, além de menor recrutamento e proliferação de linfócitos T (ANANTAPREECHA et al., 2005).

A produção de citocinas características da resposta do tipo Th2, incluindo a IL-4, é aumentada pela vitamina D e a produção de IL-2, TNF- α e IFN- γ é reduzida. Desta forma, observa-se que a vitamina D polariza a resposta imune para o tipo TH2, em detrimento da resposta Th1 que promoveria uma depuração mais eficiente de várias infecções virais, incluindo hepatite B e dengue (MULLER et al., 1991; BELLAMY et al., 1999; LOKE et al., 2002).

Em relação a estudos da vitamina D e os arbovírus, foram encontrados níveis aumentados de receptores de vitamina D no plasma de pacientes com dengue grave quando relacionados ao grupo controle (ALBUQUERQUE, 2007).

4 OBJETIVOS

4.1 Objetivo Geral

Avaliar os níveis de 25 (OH) vitamina D em pacientes acometidos por infecção causada pelos vírus Chikungunya e Zika.

4.2 Objetivos Específicos

- a) Realizar testes sorológicos para IgM e IgG das infecções por arbovírus, visando selecionar os grupos de trabalho;
- b) Avaliar os níveis de 25(OH) vitamina D nas amostras selecionadas dos pacientes portadores dos vírus Chikungunya e Zika;
- c) Verificar se existe associação entre a sintomatologia e a dosagem de vitamina D em pacientes infectados por Chikungunya e Zika.

5 METODOLOGIA

5.1 População de estudo

O estudo foi realizado no estado da Paraíba, em parceria com a Secretaria de Saúde do Estado. Foram incluídos 181 pacientes em dois grupos de análise, os quais dois pacientes não apresentaram dados completos para os resultados de sorologia (Tabela 2). O primeiro foi constituído de 91 indivíduos adultos com sintomatologia para Chikungunya ou Zika, sendo a inclusão dos pacientes e obtenção de amostras biológicas realizadas em Março de 2016, na cidade de Arara. Posteriormente, em Julho de 2016, para a formação do segundo grupo, foram realizadas coletas de amostras biológicas de 46 mães que tiveram algum sintoma de infecção por Zika durante a gravidez, e 42 bebês com microcefalia, em outras 14 cidades da Paraíba: Monteiro, Princesa Isabel, Itaporanga, Cajazeiras, Souza, Catolé do Rocha, Pombal, Patos, Picuí, Esperança, Guarabira, Mamanguape e Itabaiana.

Tabela 2 – Número de pacientes incluídos nos dois grupos do estudo.

	Total
Grupo 1: Sintomatologia ativa	91
Grávidas	21
Não grávidas	58
Homens	12
Grupo 2: Mães e filhos microcefálicos	88
Bebês com microcefalia	42
Mães	46

Fonte: Elaborada pela autora (2017);

5.2 Considerações Éticas

O projeto obteve aprovação do comitê de ética em Novembro de 2016, sob o título “Identificação de alvos moleculares em infecções por Arbovírus e doenças correlatas”, CAAE: 61603316.7.0000.5208, Parecer No. 1.815.581. Todos os pacientes assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido declarando estar cientes da proposta do projeto e concordando com a coleta das amostras biológicas e dados clínicos e sócio-demográficos.

5.3 Obtenção das Amostras

O sangue foi coletado por punção venosa a vácuo, em tubo seco com gel separador e em tubo com anticoagulante (EDTA), para posterior centrifugação e separação dos soros e plasmas, respectivamente, tanto para as dosagens das imunoglobulinas IgG e IgM dos pacientes (dos arbovírus em estudo), como para a dosagem da 25-(OH)vitamina D, através do kit comercial ARCHITECT 25-OH Vitamin D (*Abbott Laboratories*), um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) para a determinação quantitativa da 25-hidroxivitamina D (25-OH vitamina D) em soro ou plasma humanos. Os soros e os plasmas foram estocados a -80°C no Laboratório de Imunopatologia Keizo Asami, até o momento da realização de todas as dosagens.

5.4 Processamento das amostras

As dosagens das imunoglobulinas IgG e IgM tanto para o ZIKV como para o CHIKV, foram realizadas no setor de Virologia do LIKA, utilizando kits comerciais da marca EUROIMMUN Diagnóstico Médico-laboratorial Brasil, que utiliza a técnica de ELISA (*Enzyme Linked Immunono Sorbent Assay*) para a realização dos exames, e tem o seguinte princípio para o teste:

- Em uma segunda etapa, os anticorpos ligados são detectados utilizando autoanticorpo marcado com peroxidase.
- Em uma terceira etapa, os anticorpos tornam-se visíveis usando-se o cromógeno, que é capaz de proporcionar uma reação de cor. A intensidade da cor produzida é proporcional à concentração de anticorpos na amostra de soro.
- O ELISA monoespecífico (com um único antígeno), proporciona material “in vitro” quantitativo para detecção de anticorpos. O perfil de ELISA proporciona um material “in vitro” semiquantitativo, para detecção de diferentes anticorpos em uma única microplaca.
- A fase sólida do Pool ELISA é coberta com uma composição de antígenos, para detecção semiquantitativa de anticorpos cuja especificidade deve ser investigada em sequência através de material monoespecífico.

5.5 Dosagem de Vitamina D

As amostras foram dosadas utilizando o kit ARCHITECT 25-OH Vitamin D (*Abbott Laboratories*), um imunoensaio de micropartículas por quimioluminescência (CMIA) para a determinação quantitativa da 25-hidroxivitamina D (25-OH vitamina D) em soro ou plasma humanos. A realização do ensaio foi feita seguindo as orientações do fabricante, na Unidade de Laboratório e Análises Clínicas do HC/UFPE. No teste, a amostra, o diluente do ensaio e as micropartículas paramagnéticas revestidas de anticorpos anti-vitamina D são combinados. A 25-OH vitamina D presente na amostra se solta da proteína de ligação da vitamina D e liga-se às micropartículas revestidas de anticorpos anti-vitamina D, formando um complexo antígeno-anticorpo. Após a incubação, um conjunto contendo vitamina D marcada com acridínio é adicionado à mistura de reação e liga-se aos locais de ligação não-ocupados das micropartículas revestidas de anticorpos anti-vitamina D. Após nova incubação e lavagem, as soluções pré-ativadora e ativadora são adicionadas à mistura de reação. A reação quimioluminescente resultante é medida em unidades de luz relativas (RLUs). Há uma relação entre a quantidade de 25-OH vitamina D na amostra e as RLUs detectadas pela ótica do ARCHITECT iSystem. Os resultados foram calculados automaticamente com base na curva de calibração previamente estabelecida. Foram dosados juntamente com as amostras, soros controles de qualidade interno em três níveis (baixo, médio e alto), que tiveram seus valores compatíveis com o esperado, garantindo assim, a qualidade dos ensaios. O ensaio ARCHITECT 25-OH Vitamin D possui linearidade de 3,4 a 155,9 ng/mL, a sensibilidade do ensaio definida como o valor mais baixo diferente de zero, é de 1,6 ng/mL.

5.7 Análise estatística

A análise estatística foi feita utilizando o programa GraphPad Prism version 7.0 (GraphPad Software, CA). O teste Chi-square e Exato de Fisher foram usados para analisar os dados demográficos ANOVA One-Way e teste t-Student foram feitos para investigar a significância da hipótese. Valores $p < 0.05$ foram considerados estatisticamente significativos.

6 RESULTADOS E DISCUSSÃO

O presente trabalho avaliou os níveis de vitamina D em pacientes com sintomatologia de infecção por arboviroses (zika e chik). Para tanto, foram realizados testes de sorologia para identificar anticorpos contra os vírus da dengue, zika e chikungunya. Tal arboviroses tem causado epidemias em vários países da América Latina e do pacífico, afetando grávidas com um amplo espectro de resultados (RODRIGUEZ-MORALES, 2016; MUSSO; GUBLER, 2016). Há um crescente corpo de evidências que sugerem que ZIKV é responsável por complicações congênitas graves, constituídas principalmente por microcefalia, porém a extensão das complicações congênitas relacionadas à ZIKV é, no entanto, ainda uma questão de debate, principalmente porque uma pequena proporção dos casos foi totalmente investigada (PANCHAUD et al., 2016). Por outro lado, o CHIKV tem levado à altos índices de morbidade devido à sua sintomatologia (FARIA et al., 2016).

No grupo 1, é possível observar altas taxas de infecção por arboviroses, apesar de homens terem sido em menor número no estudo e menos afetados pelo ZIKV. Por outro lado, apesar de 93% das mães do grupo 2 apresentaram positividade para infecção pelo ZIKV, apenas 26% das crianças apresentam anticorpo contra o ZIKV (Tabela 3).

Tabela 3 - Caracterização da população estudada de acordo com o percentual de positividade para infecção por ZIKV, CHIKV ou DENV através de testes sorológicos.

	Total	ZIKV⁺ (%)	CHIKV⁺ (%)	DENV⁺ (%)
Grupo 1: Sintomatologia ativa	91	73 (80)	80 (88)	86 (95)
Grávidas	21	15 (71)	17 (81)	19 (90)
Não grávidas	58	50 (86)	51 (88)	57 (98)
Homens	12	8 (66)	12 (100)	10 (83)
Grupo 2: Mães e filhos microcefálicos	88	54 (61)	20 (23)	54 (88)
Bebês com microcefalia	42	11 (26)	5 (12)	13 (31)
Mães	46	43 (93)	15 (33)	41 (89)

Fonte: Elaborada pela autora (2017).

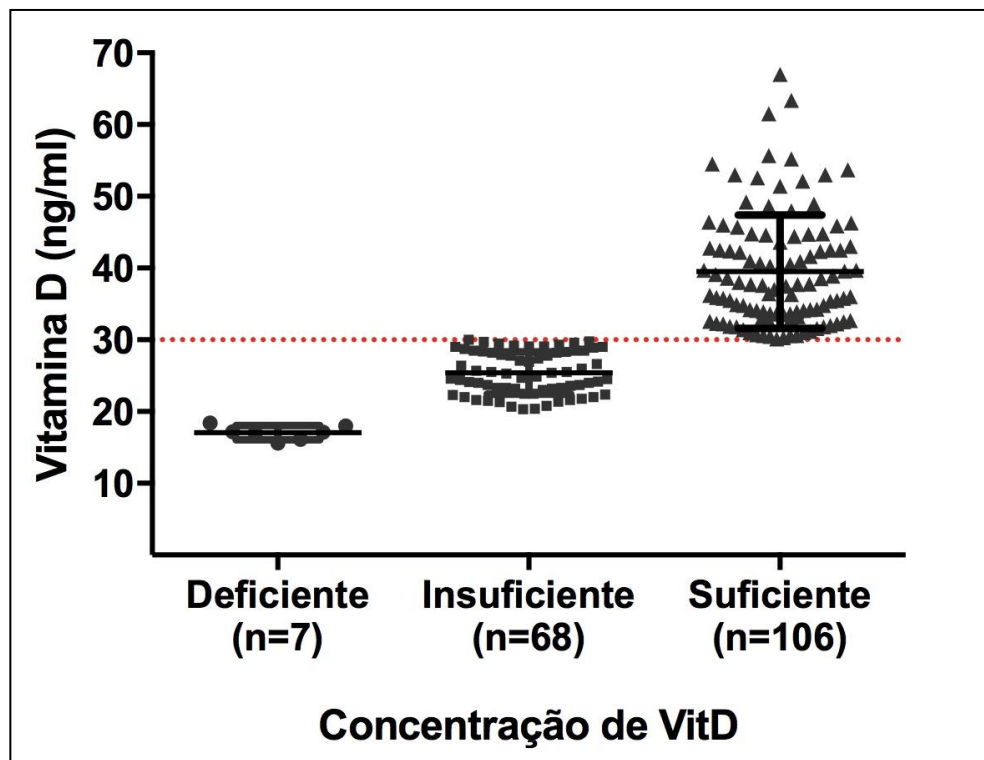
Em 2016 foram confirmados 130.701 casos de Zika no Brasil, e no corrente ano, até o final de janeiro, 58 novos casos foram confirmados. Em relação às gestantes, foram registrados 69 casos prováveis, destes, 7 confirmados (BRASIL, 2017). Em um estudo realizado nas Ilhas Yap, na Micronésia, foram encontradas as taxas de 17,9% e 11,4% de mulheres e homens respectivamente infectados pelo ZIKV para cada 1.000 habitantes, ou seja, o percentual foi maior entre as mulheres do que entre os homens, em contraste a prevalência de anticorpos IgM

contra o ZIKV foi maior nos participantes do sexo masculino (77% x 68%) (DUFFY et al., 2009).

Em relação à chikungunya, segundo o último boletim epidemiológico da Secretaria de Vigilância em Saúde, em 2016 foram comprovadas 151.318 pessoas infectadas pelo CHIKV no Brasil, com 196 óbitos, sendo 58 em Pernambuco e 34 na Paraíba. Em 2017, até o dia 30 de janeiro, foram confirmados 564 novos casos, com um óbito na Bahia (BRASIL, 2017). A maioria das infecções por CHIKV que ocorrem durante a gravidez não levam à transmissão do vírus para o feto; mas se a viremia ocorre no momento do parto pode levar a complicações que incluem doenças neurológicas, miocárdicas e hemorragia (STAPLES et al., 2009).

A dosagem de vitamina D foi realizada em todos os pacientes do estudo (Figura 5), e os resultados analisados de acordo com o valor de referência determinado pelas sociedades internacionais e de acordo com a metodologia de HOLICK et al., (2011). Neste estudo, um total de 58,56% dos pacientes avaliados apresentou valores suficientes de vitamina D.

Figura 5- Dosagem de vitamina D realizada em todos os indivíduos incluídos no estudo.

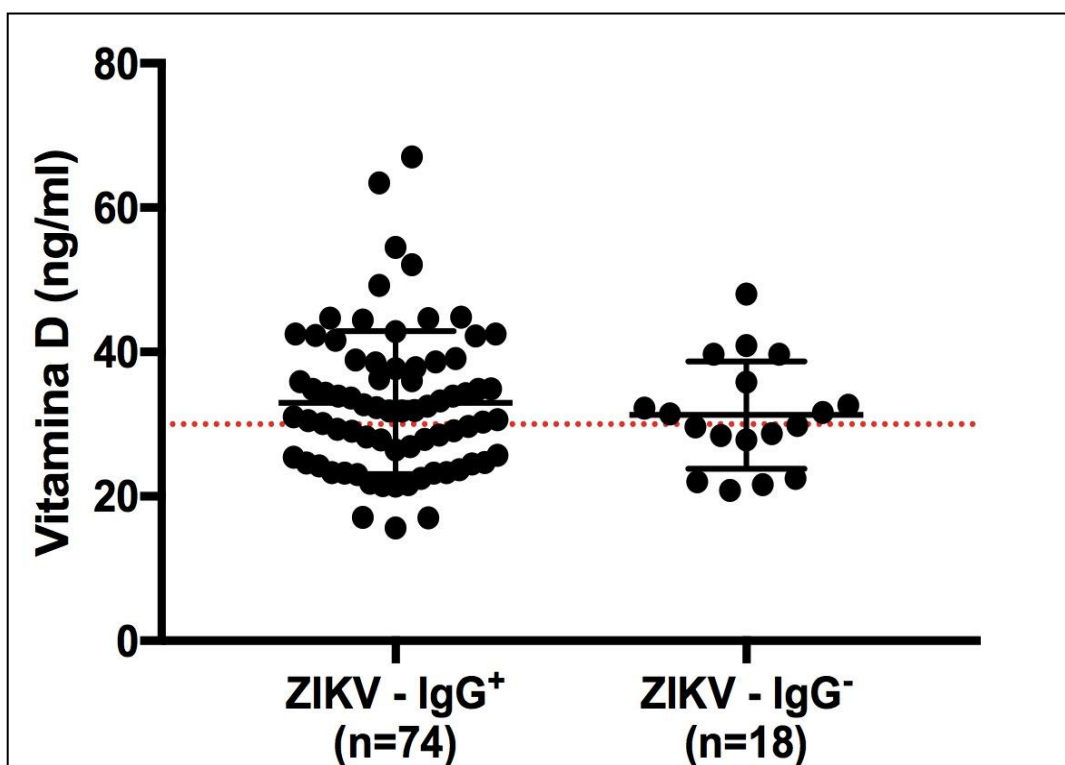


Fonte: Dados da pesquisa (2017).

6.1 Análise da concentração de Vitamina D em pacientes adultos com sintomatologia de fase aguda para infecção por arboviroses

Dentre os pacientes adultos, 67,74% apresentaram positividade para ZIKV-IgG, DENV-IgG e CHIKV-IgM. Um total de 79,56% dos pacientes foram positivos para ZIKV-IgG, dos quais apenas 2 foram negativos para DENV-IgG. Nenhum dos pacientes apresentou resultado positivo para ZIKV-IgM. No entanto, para chikungunya 87,09% dos pacientes apresentaram positividade para IgM, dos quais um paciente também apresentou IgM positivo para DENV. Em relação aos níveis de vitamina D, 59,46% dos pacientes adultos ZIKV-IgG⁺ apresentaram valores suficientes, enquanto 36,48% foram insuficientes e 4,05% foram deficientes. Entre os pacientes ZIKV-IgG⁻ o percentual foi de 50% para valores suficientes de vitamina D, enquanto que os outros 50% apresentaram valores insuficientes (Figura 6).

Figura 6 - Dosagem de vitamina D em adultos de acordo com a sorologia positiva para ZIKV.



Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Na Tabela 4 estão representados os dados referentes a correlação entre a infecção pelo vírus Zika e a concentração de vitamina D. A análise da influência da concentração de vitamina D foi realizada exclusivamente para o grupo de pacientes com infecção confirmada pelo vírus Zika.

Tabela 4 - Análise da relação entre Vitamina D e sintomatologia em pacientes IgG positivos para o vírus Zika.

Sintomas	ZIKV (IgG)				Vitamina D em pacientes com ZIKV-IgG ⁺			
	Pos. (%)	Neg. (%)	Valor de p	RR (95% IC)	Deficiente	Suficiente	Valor de p	RR (95% IC)
Afta								
Presente	17 (23,29)	05 (27,78)	0,761	0,9521	08 (27,59)	09 (20,45)	0,575	1,255
Ausente	56 (76,71)	13 (72,22)		(0,739 - 1,227)	21 (72,41)	35 (79,55)		(0,684 - 2,303)
Rash cutânea								
Presente	34 (46,58)	11 (61,11)	0,303	0,891	08 (27,59)	26 (59,09)	0,009**	0,437
Ausente	39 (53,42)	07 (38,89)		(0,725 - 1,096)	21 (72,41)	18 (40,91)		(0,223 - 0,855)
Febre alta								
Presente	54 (73,97)	14 (77,78)	1,00	0,961	19 (65,52)	35 (79,55)	0,275	0,668
Ausente	19 (26,03)	04 (22,22)		(0,769 - 1,202)	10 (34,48)	09 (20,45)		(0,382 - 1,170)
Febre constante								
Presente	19 (26,03)	06 (33,33)	0,563	0,929	08 (27,59)	11 (25,00)	1,00	1,083
Ausente	54 (73,97)	12 (66,67)		(0,725 - 1,190)	21 (72,41)	33 (75,00)		(0,580 - 2,022)
Mialgia								
Presente	58 (79,45)	15 (83,33)	1,00	0,953	25 (86,21)	33 (75,00)	0,376	1,616
Ausente	15 (20,55)	3 (16,67)		(0,752 - 1,209)	04 (13,79)	11 (25,00)		(0,664 - 3,936)
Cefaléia								
Presente	46 (63,01)	16 (88,89)	0,047*	0,797	22 (75,86)	24 (54,55)	0,084	1,845
Ausente	27 (36,99)	02 (11,11)		(0,667 - 0,951)	07 (24,14)	20 (45,45)		(0,911 - 3,736)
Olhos vermelhos								
Presente	20 (27,40)	04 (22,22)	0,772	1,053	09 (31,03)	11 (25,00)	0,601	1,193
Ausente	53 (72,60)	14 (77,78)		(0,848 - 1,309)	20 (68,97)	33 (75,00)		(0,657 - 2,163)
Dor retro orbital								
Presente	27 (36,99)	07 (38,89)	1,00	0,984	14 (48,28)	13 (29,55)	0,139	1,590
Ausente	46 (63,01)	11 (61,11)		(0,795 - 1,218)	15 (51,72)	31 (70,45)		(0,915 - 2,762)
Artralgia								
Presente	68 (93,15)	16 (88,89)	0,621	1,133	28 (96,55)	40 (90,91)	0,642	2,059

Ausente	05 (6,85)	02 (11,11)		(0,701 -1,832)	01 (03,45)	04 (09,09)		(0,348 – 12,16)
Edema								
Presente	41 (56,16)	09 (50,00)	0,792	1,051	16 (55,17)	25 (56,82)	1,00	0,961
Ausente	32 (43,84)	09 (50,00)		(0,853 – 1,293)	13 (44,83)	19 (43,18)		(0,544 – 1,694)
Astenia								
Presente	45 (61,64)	11 (61,11)	1,00	1,004	20 (68,97)	25 (56,82)	0,334	1,383
Ausente	28 (38,36)	07 (38,89)		(0,814 – 1,240)	09 (31,03)	19 (43,18)		(0,736 – 2,595)
Vômito								
Presente	20 (27,40)	8 (44,44)	0,168	0,849	07 (24,14)	13 (29,55)	0,789	0,843
Ausente	53 (72,60)	10 (55,56)		(0,656 – 1,099)	22 (75,86)	31 (70,45)		(0,428 – 1,660)
Eritemas								
Presente	27 (36,99)	05 (27,78)	0,586	1,082	09 (31,03)	18 (40,91)	0,462	0,767
Ausente	46 (63,01)	13 (72,22)		(0,885 – 1,324)	20 (68,97)	26 (59,09)		(0,409 – 1,435)
Parestesia								
Presente	27 (36,99)	07 (38,89)	1,00	0,984	11 (37,93)	16 (36,36)	1,00	1,041
Ausente	46 (63,01)	11 (61,11)		(0,795 – 1,218)	18 (62,07)	28 (63,64)		(0,583 – 1,861)
Sangramento								
Presente	05 (6,85)	01 (05,56)	1,00	1,042	01 (03,45)	04 (09,09)	0,642	0,486
Ausente	68 (93,15)	17 (94,44)		(0,717 – 1,513)	28 (96,55)	40 (90,91)		(0,082 – 2,870)
Diarréia								
Presente	19 (26,03)	10 (55,56)	0,024*	0,752	09 (31,03)	10 (22,73)	0,586	1,279
Ausente	54 (73,97)	08 (44,44)		(0,568 – 0,996)	20 (68,97)	34 (77,27)		(0,710 – 2,303)
Paralisia dos membros								
Presente	04 (5,48)	00 (00,00)	0,581	1,261	04 (13,79)	00 (00,00)	0,021*	2,760
Ausente	69 (94,52)	18 (100,0)		(1,133 - 1,404)	25 (86,21)	44 (100,0)		(2,018 - 3,775)
Conjuntivite								
Presente	03 (4,11)	00 (00,00)	1,00	1,257	02 (06,90)	01 (02,27)	0,559	1,728
Ausente	70 (95,80)	18 (100,0)		(1,131 - 1,398)	27 (93,10)	43 (97,73)		(0,736 - 4,057)

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

A cefaléia e a diarreia foram os únicos sintomas diretamente relacionados com a presença do Zika ($p=0,047$ e $p=0,024$, respectivamente). No entanto, a ocorrência de cefaléia e de diarreia não se relacionem com concentração de vitamina D ($p=0,084$ e $p=0,586$ respectivamente). Por outro lado, a ocorrência de rash cutânea apresentou correlação com os níveis de vitamina D ($p=0,009$), assim como paralisia dos membros ($p=0,021$), embora não tenha sido encontrada significância entre estes sintomas e a infecção pelo ZIKV.

A ocorrência de febre apresentou comportamento curioso, visto que a febre alta é observada igualmente em pacientes com ou sem ZIKV, sem correlação com a suficiência de vitamina D. Por outro lado, a febre constante tem comportamento inverso, sendo igualmente observada em ambos os grupos deficiente e suficiente, e não apresenta relação com a presença do vírus. Similarmente, mialgia, dor retro orbital, astenia, parestesia, sangramento e conjuntivite ocorrem indistintamente em pacientes com ou sem infecção por Zika. O mesmo se observa para parestesia e edema com relação à suficiência ou deficiência de vitamina D, sendo eventos completamente independentes.

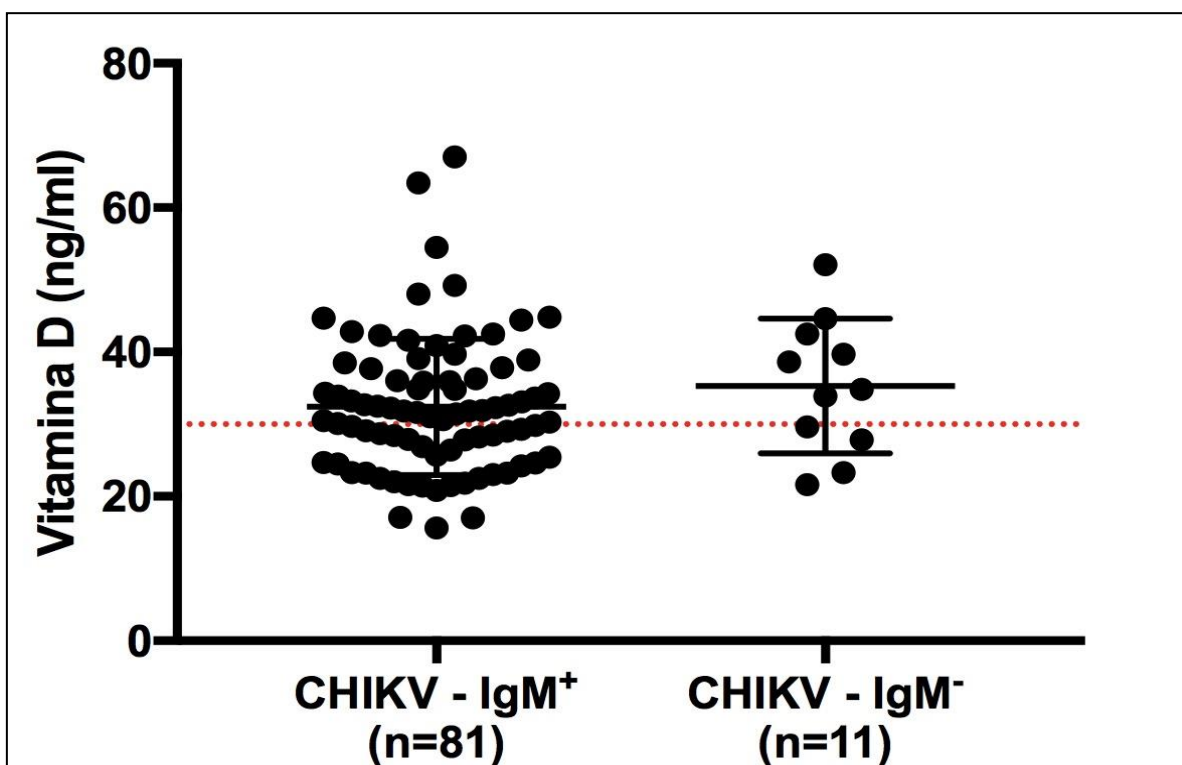
No primeiro relato de Zika na Espanha, um paciente de 49, ao voltar da Colômbia, apresentou diarreia como primeiro sintoma, acompanhado de febre leve ($37,3^{\circ}\text{C}$). O quadro evoluiu com artralgia em múltiplas articulações e dor retro orbital. O paciente não apresentou dor de cabeça, rash cutâneo ou mialgia (BACHILLER-LUQUE et al., 2016). Este relato clínico concorda com os achados apresentados da ocorrência de diarreia, embora os pacientes não tenham apresentado estatisticamente febre constante. Outro caso relatado de paciente viajante retornando à Suíça, mulher 51 anos, apresentou rash cutânea em várias partes do corpo sem nenhum outro sintoma de infecção sistêmica. O quadro evoluiu com piora da rash, surgimento de conjuntivite, edema nas extremidades e linfadenopatia. O primeiro diagnóstico realizado através de testes rápidos não indicou presença de nenhum dos arbovírus, no entanto poucos dias após o teste foi repetido e positivou IgG para o vírus dengue. Através de RT-PCR e outro teste sorológico foi detectado o falso positivo para dengue devido à reação cruzada, sendo o diagnóstico final de Zika (GINIER et al., 2016). Na população analisada neste estudo o vírus da Zika não foi significativamente associado ao rash cutâneo ou ao edema. No entanto, a correlação de rash com níveis de vitamina D pode indicar que futuros estudos em países com menores graus de exposição solar tenham uma resposta diferente da encontrada neste estudo.

De acordo com dados da literatura, a ocorrência de hemorragias (sangramento) em pacientes de Zika é ausente (IOOS et al., 2014). No entanto, 5 entre 74 pacientes ZIKV⁺ deste estudo apresentaram sangramento. Este dado torna-se epidemiologicamente importante devido

a sua ocorrência em particular na população do Nordeste brasileiro - cenário do surto inédito de microcefalia associada à infecção pelo ZIKV, podendo no futuro tornar-se um dado tendencioso para ser estudado, caso ocorram novos surtos, principalmente nessa região.

Diferentemente do grupo estudado para infecção pelo ZIKV, os pacientes infectados por CHIKV foram avaliados num período mais próximo da fase aguda da doença, apresentando reação positiva para IgM na maioria dos casos. Um total de 58% destes pacientes apresentaram níveis de vitamina D suficiente, enquanto que 33,33% foram insuficientes e 3,7% foram deficientes para vitamina D. Apenas 11,83% dos pacientes apresentaram sorologia negativa para CHIKV, enquanto um paciente não apresentou resposta. Um percentual de 63,63% dos pacientes CHIKV-IgM⁻ apresentaram níveis adequados de vitamina, enquanto os outros 36,35% foram insuficientes (Figura 7).

Figura 7- Dosagem de vitamina D em adultos de acordo com a sorologia para CHIKV.



Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Na Tabela 5 estão apresentados os resultados da correlação entre a sintomatologia, infecção por chikungunya e a concentração de vitamina D. Nesta análise, nenhum dos sintomas apresentou correlação estatística com a infecção por CHIKV. Já em relação à vitamina D, apenas rash cutânea apresentou significância ($p=0,024$). Este resultado é similar ao observado

com o vírus Zika, o que pode indicar que os sintomas de pele em arboviroses estão relacionados a suficiência de vitamina D. Cefaléia e paralisia dos membros apresentaram valores de p próximo da significância ($p=0,058$ e $p=0,073$ respectivamente), embora apenas cefaléia tenha sido igualmente observada em pacientes com ou sem CHIKV. A ocorrência de aftas, mialgia, astenia, eritemas, alterações de visão e sangramentos se comportou estatisticamente como a cefaléia, estando igualmente distribuída entre pacientes com ou sem CHIKV. Febre constante, olhos vermelhos, conjuntivite e sangramento foram observados igualmente nos dois grupos analisados quanto a concentração de vitamina D.

Os sintomas clínicos descritos para infecção por Chikungunya excluem presença de edema ou sangramento (IOOS et al., 2014). Na população aqui analisada, dentre os indivíduos CHIKV⁺, 43 de 80 pacientes reportou edema e somente 4 em 80 reportou sangramento. A ocorrência destes sintomas pode indicar um perfil diferencial de sintomatologia das arboviroses no Nordeste brasileiro. Já um estudo do perfil clínico de 109 pacientes CHIKV⁺ na população colombiana caribenha encontrou artralgia em até 82% dos pacientes; 72% de mialgia; 55% de edema; febre em 89% dos pacientes; rash cutânea em 73%; cefaléia em 69%; vômito 19%; sangramento em 5% e astenia em 82% dos pacientes (JALLER RAAD et al., 2016). Em comparação com a população estudada no presente trabalho, vale ressaltar aumento de aproximadamente 10% na presença de artralgia enquanto a febre é 16% menos frequente. Outra diferença considerável está na ocorrência de rash cutânea e astenia, pelo menos 20% menor em nossa população.

Presente	54 (67,50)	08 (72,73)	1,00	0,971	27 (79,41)	27 (58,70)	0,058	1,857
Ausente	26 (2,50)	03 (27,27)		(0,831 - 1,136)	07 (20,59)	19 (41,30)		(0,934 - 3,693)
Olhos vermelhos								
Presente	23 (28,75)	01 (09,09)	0,276	1,126	10 (29,41)	13 (28,26)	1,00	1,033
Ausente	57 (71,25)	10 (90,91)		(0,989 - 1,283)	24 (70,59)	33 (71,74)		(0,592 - 1,802)
Dor retro orbital								
Presente	32 (40,00)	02 (18,18)	0,199	1,118	17 (50,00)	15 (32,61)	0,166	1,500
Ausente	48 (60,00)	09 (81,82)		(0,971 - 1,286)	17 (50,00)	31 (67,39)		(0,908 - 2,478)
Artralgia								
Presente	73 (91,25)	11 (100,0)	0,591	0,869	32 (94,12)	41 (89,13)	0,692	1,534
Ausente	7 (8,75)	00 (00,00)		(0,799 - 0,944)	02 (05,88)	05 (10,87)		(0,462 - 5,094)
Edema								
Presente	43 (53,75)	07 (63,64)	0,748	0,953	21 (61,76)	22 (47,82)	0,260	1,390
Ausente	37 (46,25)	04 (36,36)		(0,819 - 1,108)	13 (38,24)	24 (52,17)		(0,814 - 2,372)
Astenia								
Presente	49 (61,25)	07 (63,64)	1,00	0,988	23 (67,65)	26 (56,52)	0,359	1,323
Ausente	31 (38,75)	04 (36,36)		(0,846 - 1,153)	11 (32,35)	20 (43,48)		(0,755 - 2,317)
Vômito								
Presente	23 (28,75)	05 (45,45)	0,303	0,908	08 (23,53)	15 (32,61)	0,457	0,762
Ausente	57	06 (54,55)		(0,750 - 1,098)	26 (76,47)	31 (67,39)		(0,407 - 1,428)

	(71,25)							
Eritemas								
Presente	28 (35,00)	04 (36,36)	1,00	0,993	10 (29,41)	18 (39,13)	0,478	0,774
Ausente	52 (65,00)	07 (63,64)		(0,845 - 1,166)	24 (70,59)	28 (60,87)		(0,434 - 1,378)
Parestesia								
Presente	31 (38,75)	03 (27,27)	0,528	1,061	15 (44,12)	16 (34,78)	0,488	1,248
Ausente	49 (61,25)	08 (72,73)		(0,915 - 1,230)	19 (55,88)	30 (65,22)		(0,752 - 2,070)
Sangramento								
Presente	06 (07,50)	00 (00,00)	1,00	1,149	02 (05,88)	04 (08,70)	1,00	0,771
Ausente	74 (92,50)	11 (100,0)		(1,058 - 1,247)	32 (94,12)	42 (91,03)		(0,241 - 2,463)
Diarréia								
Presente	27 (33,75)	02 (18,18)	0,492	1,089	13 (38,24)	14 (30,43)	0,484	1,215
Ausente	53 (66,25)	09 (81,82)		(0,944 - 1,256)	21 (61,76)	32 (69,57)		(0,727 - 2,031)
Paralisia dos membros								
Presente	03 (03,75)	01 (09,09)	0,408	0,847	03 (08,82)	00 (00,00)	0,073	2,484
Ausente	77 (96,25)	10 (90,91)		(0,479 - 1,500)	31 (91,18)	46 (100,0)		(1,892 - 3,261)
Conjuntivite								
Presente	02 (02,50)	01 (09,09)	0,324	0,752	01 (02,94)	01 (02,17)	1,00	1,182
Ausente	78 (97,50)	10 (90,91)		(0,337 - 1,680)	33 (97,06)	45 (97,83)		(0,288 - 4,842)

Em junho de 2014 houve uma epidemia de Chikungunya no Suriname e os dados clínico-epidemiológicos de 180 pacientes foram analisados, demonstrando que 68% dos pacientes infectados por CHIKV eram mulheres. Os sintomas estatisticamente associados à presença de CHIKV foram artralgia, cefaléia, dor nos dedos, febre, mialgia, rash cutânea, coceira e dor nos olhos (VAN GENDEREN et al., 2016). Há discrepância entre as significâncias encontradas na epidemia do Suriname e as reportadas pela população estudada do Nordeste brasileiro. Assim como na população Colombiana, foi reportado sangramento (JALLER RAAD ET al., 2016), indicando que talvez seja possível observar alteração de comportamento sintomatológico nas infecções mais recentes.

Apesar de não ter obtido significância estatística mais de 91% dos pacientes com Chikungunya reportou artralgia. Dada a ocorrência destes sintomas osteo-articulares, alguns estudos já têm indicado fazer suplementação com vitamina D. Dentre 159 pacientes franceses 20% realizou suplementação, no entanto não se avaliou seu efeito adjuvante na terapia aplicada (JAVELLE et al., 2015). Outro estudo fez uma revisão do manejo clínico dos pacientes com CHIKV e indica o uso de vitamina D para fortalecimento ósseo (BALBIR-GURMAN; KRUTIKOV; MANSON, 2016).

Considerados em conjunto, os dados gerais de sintomatologia para infecção por ZIKV e CHIKV em adultos mostram que não há diferenças consideráveis entre estas arboviroses. Este dado observado nesta população estudada corrobora com outros previamente reportados (PATTERSON; SAMMON; GARG, 2016). Em ambas viroses a rash cutânea está significativamente relacionada com a suficiência de vitamina D. Dada a considerável dificuldade em realizar o diagnóstico diferencial baseando-se apenas nos sintomas, este estudo ressalta o valor do diagnóstico sorológico para adequar o manejo clínico dos pacientes. Adicionalmente, como a sintomatologia clínica para ZIKV e CHIKV é similar, conforme observado nos dados apresentados, o diagnóstico sorológico e molecular parece independe das observações sintomáticas (MUSSO et al., 2015). É importante salientar que a população estudada apresentou positividade para infecções prévias de Dengue, sendo mais difícil determinar o quanto esta ocorrência pode influenciar na presença e na intensidade dos sintomas.

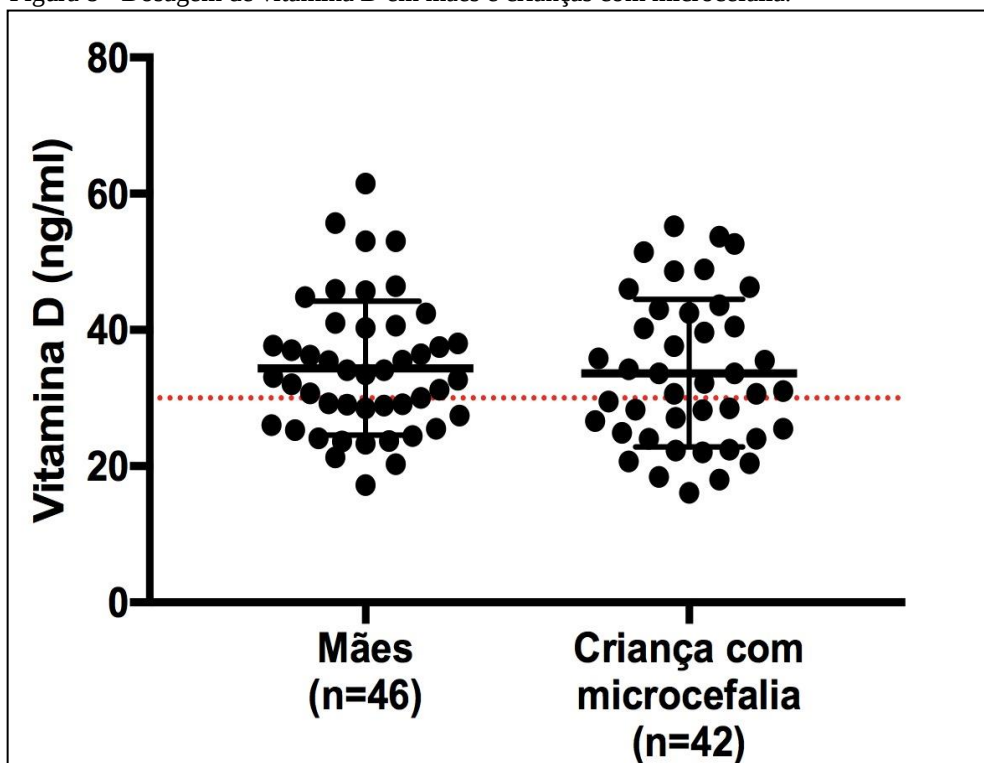
6.2 Análise da concentração de Vitamina D em mães e bebês com microcefalia

Mães e crianças com microcefalia foram avaliadas quanto à presença de anticorpos contra ZIKV, DENV e CHIKV assim como para os níveis de vitamina D. Três mães não apresentavam anticorpos para ZIKV ou CHIKV, apenas DENV-IgG⁺. Um total de 34,88% das mães ZIKV-IgG⁺ eram CHIKV-IgG⁺, dos quais 53,33% também eram CHIKV-IgM⁺, indicando uma possível re-infecção. Dentre as crianças com microcefalia, apenas 23,91% eram ZIKV-IgG⁺ e 11,90% eram CHIKV-IgG⁺. Dentre as crianças positivas para ZIKV-IgG, 36,36% também eram DENV-IgG⁺ e 27,27% também eram CHIKV-IgG⁺. Apenas 1 criança apresentou positividade para CHIKV-IgM, sendo também CHIKV-IgG⁺. Nenhuma criança apresentou positividade para ZIKV-IgM ou DENV-IgM.

Dentre as 46 mães envolvidas no estudo, 26 reportaram o período específico da infecção na gravidez. Dentre estas, 50% ocorreu no primeiro trimestre de gestação; 42% durante o segundo trimestre e somente 1 paciente aos oito meses de gravidez. Neste grupo de pacientes, 100% apresentaram IgG positivo para ZIKV; 88% IgG positivo para DENV e 42% positivos para CHIKV IgG - sete destas pacientes foram também IgM positivos.

Um total de 60,87% das mães apresentavam valores suficientes de vitamina D no momento da coleta, das quais 92,86% apresentaram ZIKV-IgG⁺. Por outro lado, 36,96% das mães apresentavam valores insuficientes e 2,17% apresentou deficiência de vitamina D. Para as crianças, 57,14% apresentaram níveis suficientes de vitamina D.

Figura 8 - Dosagem de vitamina D em mães e crianças com microcefalia.



Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Nas tabelas 6 e 7 estão representados os dados de dosagem de vitamina D em mães e filhos, respectivamente. 57% das mães estavam infectadas por ZIKV e tinham vitamina D suficiente. Para CHIKV a maioria das mães (39%) apresentou concentração de vitamina D suficiente, mas não apresentaram sorologia positiva para o vírus Chikungunya. Não foi encontrada significância estatística entre a presença do vírus e a concentração de vitamina D.

Tabela 6 - Correlação entre concentração de Vitamina D em mães de bebês com microcefalia e a infecção por arboviroses.

VITAMINA D				
	Deficiente (%)	Suficiente (%)	Valor de p	RR (95% IC)
ZIKV				
Positivo (%)	17 (37)	26(57)	1	1,186 (0,4277 – 6,59)
Negativo(%)	1 (2)	2 (4)		
CHIKV				
Positivo (%)	5 (11)	10 (22)	0,7494	0,7949 (0,3335 – 1,679)
Negativo(%)	13 (28)	18 (39)		

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

As dosagens de vitamina D em crianças com microcefalia não se correlacionaram estatisticamente com a presença dos arbovírus. No entanto, é válido ressaltar que a maioria (43%) das crianças apresentaram Vitamina D suficiente e sorologia negativa para ZIKV. Comportamento semelhante foi observado para CHIKV: 50% dos bebês foram suficientes para vitamina D e negativos sorologicamente para o vírus.

Tabela 7 - Correlação entre concentração Vitamina D em bebês com microcefalia e infecção por arbovírus ZIKV e CHIKV.

VITAMINA D				
	Deficiente (%)	Suficiente (%)	Valor de p	RR (95% IC)
ZIKV				
Positivo (%)	5 (12)	6 (14)	1	1,084 (0,4667 – 2,151)
Negativo (%)	13 (31)	18 (43)		
CHIKV				
Positivo (%)	2 (5)	3 (7)	1	0,925 (0,2613 – 2,107)
Negativo (%)	16 (38)	21 (50)		

Fonte: Dados da pesquisa (2017).

Vários estudos apontam o papel imunomodulador da vitamina D, sua deficiência foi associada com diversas infecções como sepsis, pneumonia, bactérias resistentes, além de infecções virais por influenza, vírus da imunodeficiência humana adquirida e vírus da hepatite tipos B e C (WATKINS; LEMONOVICH; SALATA, 2015). As evidências indicam que o papel protetor da Vitamina D é desempenhado através de aumento de expressão de catelicidina

e β -defensina 2 em fagócitos e células epiteliais. Deste modo, é sugerido que a suplementação de vitamina D possa ser uma terapia adjuvante para tratamento de infecções (BORELLA et al., 2014). A análise da concentração de vitamina D nos indivíduos envolvidos no presente estudo foi justificada não somente pelo seu envolvimento em infecções virais, mas também porque foi associada a doenças neurológicas, como disfunção cognitiva e doenças mentais (PLUDOWSKI et al., 2013). Foi reportado que a deficiência de vitamina D e a infecção por herpes vírus leva a menor produção da interleucina 10, havendo associação com o desenvolvimento de esclerose múltipla, uma desordem neurodegenerativa progressiva (HAYES; DONALD ACHESON, 2008).

Assim como as infecções pelos arbovírus, a infecção pelo vírus influenza possui caráter sazonal. Foi observado que crianças (CANNELL et al., 2006) e adultos (FISMAN, 2012) com deficiência de vitamina D tem maior predisposição a contrair infecções sazonais. Um estudo com crianças em idade escolar mostrou que a suplementação de vitamina D diminui significativamente a susceptibilidade à infecção pelo influenza (URASHIMA et al., 2010).

Neste estudo, crianças com microcefalia foram avaliadas e apenas a minoria delas apresentou infecção por Zika ou Chikungunya. Um estudo sugere que seja realizada suplementação intensiva de vitamina D durante a gravidez para prevenir infecção pelo RSV, uma vez que há aumento de risco para infecção pelo vírus respiratório sincicial (RSV) em crianças com níveis insuficientes de vitamina D (BELDERBOS; HOUBEN, 2011). Estudos futuros precisam ser realizados a fim de confirmar se o mesmo comportamento se repete em infecções por arbovírus, viabilizando uma estratégia potencialmente eficiente e de baixo custo para prevenir ocorrência de danos neurológicos.

O grupo de vírus mais estudados com relação a deficiência de vitamina D é o do vírus da hepatite. Enquanto em australianos a concentração de vitamina D não influenciou na resposta virológica ou no estado de fibrose hepática de pacientes com hepatite C (KITSON et al., 2013), em búlgaros mais de 80% dos pacientes HCV⁺ tinham baixa dosagem de vitamina D. Observou-se também que nos pacientes com deficiência de vitamina D havia maior carga viral, fibrose hepática e menor sucesso no tratamento (GEROVA et al., 2014). Duas meta-análises corroboram com os dados encontrados pelo estudo búlgaro. Por um lado, a deficiência de vitamina D associou-se a ocorrência de fibrose hepática avançada e menor probabilidade de manter baixas cargas virais (GARCÍA-ÁLVAREZ et al., 2014). Por outro lado, pacientes com níveis de vitamina D acima de 30 ng/mL, ou aqueles que realizaram suplementação, obtiveram sucesso em manter as cargas virais (VILLAR et al., 2013).

A infecção pelo vírus da hepatite B, assim como o HCV, foi associada à dosagem de vitamina D. Baixos níveis de vitamina D foram significativamente associados a altos níveis de replicação viral (FARNIK et al., 2013). Os pacientes infectados pelo HIV com baixa dosagem de vitamina D são mais frequentemente sintomáticos e vítimas fatais (HAUG et al., 1994).

7 CONCLUSÃO

Os níveis de 25(OH)vitamina D apresentaram valores baixos na população estudada uma vez que a região Nordeste, encontra-se nos trópicos, sob maior incidência solar em comparação com os países dos hemisférios Norte e Sul. No entanto, não houve correlação dos níveis da vitamina D com a infecção pelo ZIKV e CHIKV baseados nos atuais valores de referência, levantando mais dúvidas sobre os níveis adequados para ativação imunorregulatória da vitamina D.

Os sintomas de cefaléia e diarreia estiveram relacionados à infecção por ZIKV, enquanto os níveis de 25(OH)vitamina D foram relacionados com rash cutâneo tanto para pacientes infectados por ZIKV quanto por CHIKV em pacientes adultos. Não foi encontrada diferença estatística para mães e crianças com microcefalia, no entanto ainda são necessárias mais pesquisas para identificar os danos que podem ser causados pelos baixos níveis de 25(OH)vitamina D em crianças com comprometimento neurológico, muscular, ocular, entre outros.

Grande parte da população estudada apresentou anticorpos contra DENV, o que leva a mais questionamentos em relação ao efeito modulador do sistema imune previamente exposto à infecção por Arboviroses. Este efeito poderia levar a grandes variações em relação à sintomatologia e à resposta terapêutica, assim como relacionada à gravidade de alguns casos reportados na literatura. Futuros estudos devem ser realizados numa coorte maior visando determinar o papel da 25(OH)vitamina D como molécula imunomoduladora, desde os níveis considerados suficientes até a regulação hormonal e enzimática.

REFERÊNCIAS

ANANTAPREECHA, S. et al Serological and virological features of dengue fever and dengue haemorrhagic fever in Thailand from 1999 to 2002. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 133, n. 3, p.503-507, 2005.

ATKINSON, B. et al. Detection of Zika virus in semen. **Emerging Infectious Diseases**, Atlanta, v. 22, n.5, p. 940, 2016.

BACHILLER-LUQUE, P. et al. First case of imported Zika virus infection in Spain. **Enfermedades Infecciosas y Microbiología Clínica**, Barcelona, v. 34, n. 4, p. 243-246, 2016.

BALBIR-GURMAN, A.; KRUTIKOV, M.; MANSON, J. Chikungunya Virus Infection: An Update on Joint Manifestations and Management. **Rambam Maimonides Medical Journal**, v. 7, n. 4, p. e0033, 2016.

BELDERBOS, A. M. E. et al. Cord Blood Vitamin D Deficiency Is Associated With Respiratory Syncytial Virus Bronchiolitis. **Pediatrics**, v. 127, n. 6, p. e1513–e1520, 2011.

BELLAMY, R. et al. Tuberculosis and chronic hepatitis B virus infection in Africans and variation in the vitamin D receptor gene. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 179, n. 3, p. 721–724, 1999.

BERTOLINE, D.; TZANNO-MARTINS, C. Efeitos Imunomoduladores da vitamina D. **Jornal Brasileiro de Nefrologia**, São Paulo, v. 22, n. 3, p.157-61, 2000.

BLOMBERG, J. M. et al. Vitamin D receptor and vitamin D metabolizing enzymes are expressed in the human male reproductive tract. **Human Reproduction**, Oxford, n. 25, n. 5, p. 1303-11, 2010.

BOGOCH I.I.; et al. Potential for Zika virus introduction and transmission in resource-limited countries in Africa and the Asia-Pacific region: a modelling study. **Lancet Infectious Diseases**, New York, v. 16, n. 11, p. 1237-1245, 2016.

BOORMAN, J.P.; PORTERFIELD, J.S. A simple technique for infection of mosquitoes with viruses; transmission of Zika virus. **Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 50, p. 238-42, 1956.

BORELLA, E. et al. Vitamin D: A new anti-infective agent? **Annals of the New York Academy of Sciences**, New York, v. 1317, n. 1, p. 76–83, 2014.

BOUILLON, R. et al. Vitamin D and human health: lessons from vitamin D receptor null mice. **Endocrine Reviews**, Baltimore v. 29, n. 6, p. 726-76, 2008.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Preparação e Resposta à Introdução do Vírus Chikungunya no Brasil. Brasília/ DF, 2014.

BRASIL, Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus zika até a Semana Epidemiológica 4, 2017. **Boletim epidemiológico**, v. 48, n 5, 2017.

BRIANT, L., et al. Role of skin immune cells on the host susceptibility to mosquito-borne viruses. **Virology**, New York, v. 464-465, p. 26-32, 2014.

CANNELL, J. J. et al. Epidemic influenza and vitamin D. **Epidemiology and Infection**, Cambridge, v. 134, n. 6, p. 1129–1140, 2006.

CANTORNA, M.T.; MAHON, B.D. D-hormone and the immune system. **Journal of rheumatology – Supplement**, Toronto, v. 76, p. 11-20, 2005.

CARBAJO, A.E.; VEZZANI, D. Waiting for chikungunya fever in Argentina: spatio-temporal risk maps. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v.110, n. 2, p. 259-262, 2015.

CAVALIER, E. et al. Vitamin D: current status and perspectives. **Clinical Chemistry and Laboratory Medicine**, Berlin, v. 47, n. 2, p. 120-127, 2009.

CDC - Centers for Disease Control and Prevention. **Chikungunya virus**. Atlanta: US Department of Health and Human Services; 2014. Disponível em: cdc.gov/chikungunya, consultado em 13-02-2017.

CHEN, C-I. et al. Comparative pathogenesis of epidemic and enzootic chikungunya viruses in a pregnant Rhesus macaque model. **American journal of tropical medicine and hygiene**, Baltimore, v. 83, p. 1249–58, 2010.

CHIRATHAWORN, C. et al. Cytokine levels in patients with chikungunya virus infection. **Asian Pacific Journal of Tropical Medicine**, v. 6, p. 631–34, 2013.

CHOW, A. et al. Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, Chicago, v. 203, n. 2, p. 149-57, 2011.

DANIEL, C. et al. 22-ene-oxa vitamin D: A new vitamin D analogue with profound immunosuppressive capacities. **European Journal of Clinical Investigation**, Berlin, v. 35, p. 343-49, 2005.

DAWSON-HUGHES, B. et al. Estimates of optimal vitamin D status. **Osteoporosis International**, London, v. 16, n. 7, p. 7136, 2005.

DEEB, K.K.; TRUMP, D.L.; JOHNSON, C.S. Vitamin D signalling pathways in cancer: potential for anticancer therapeutics. **Nature Reviews Cancer**, London, v. 7, n. 9, p. 684-700, 2007.

DELUCA, H.F. Overview of general physiologic features and functions of vitamin D. **The American Journal of Clinical Nutrition**, Bethesda, v. 80, p. 1689-96, 2004.

DUFFY, M.R.; et al. Zika virus outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. **N The New England Journal of Medicine**, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536-43, 2009.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL (ECDC). Zika virus infection: Factsheet for health professionals. *Factsheet for health professionals*. Stockholm: **ECDC**, 2016. Disponível em: http://ecdc.europa.eu/en/healthtopics/zika_virus_infection/factsheethealthprofessionals/Pages/factsheet_health_professionals.aspx#sthash.Ovu33Mb6.dpuf, consultado em 13-02-2017.

EYLES, D.W. et al. Distribution of the vitamin D receptor and 1 alpha-hydroxylase in human brain. **Journal of Chemical Neuroanatomy**, Amsterdam, v. 29, n. 1, p.:21-30, 2005.

FARIA, R.N; et al. Epidemiology of Chikungunya Virus in Bahia, Brazil, 2014-2015. **PLOS Currents Outbreaks**. 2016 Feb 1 . Edition 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.c97507e3e48efb946401755d468c28b2.

FARNIK, H. et al. Low vitamin D serum concentration is associated with high levels of hepatitis B virus replication in chronically infected patients. **Hepatology**, v. 58, n. 4, p. 1270–1276, 2013.

FAYE, O. et al. One-step RT-PCR for detection of Zika virus. **J Clin Virol**, v. 43, p. 96-101, 2008.

FISMAN, D. Seasonality of viral infections: mechanisms and unknowns. **Clinical Microbiology and Infection**, v. 18, n. 10, p. 946–954, 2012.

FRASER, D.R.; KODICEK, E. Unique biosynthesis by kidney of a biologically active vitamin-D metabolite. **Nature**, v. 228, n. 5273, p.764, 1970.

GALLIAN, P. et al. Epidemiology of Chikungunya Virus Outbreaks in Guadeloupe and Martinique, 2014: An Observational Study in Volunteer Blood Donors. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 11, n. 1, 2017.

GARCÍA-ÁLVAREZ, M. et al. Relationship of vitamin D status with advanced liver fibrosis and response to hepatitis C virus therapy: A meta-analysis. **Hepatology**, v. 60, n. 5, p. 1541–1550, 2014.

GARG, M.;et al. Review Article: Vitamin D and Inflammatory Bowel Disease. **Aliment Pharmacol Ther**, v. 36, n. 4, p. 324-344, 2012.

GEROVA, D. I. et al. Prevalence of vitamin D deficiency and insufficiency in Bulgarian patients with chronic Hepatitis C viral infection. **Scandinavian Journal of Clinical and Laboratory Investigation**, v. 74, n. 8, p. 665–672, 2014.

GINIER, M. et al. Zika without symptoms in returning travellers: What are the implications? **Travel Medicine and Infectious Disease**, v. 14, n. 1, p. 16–20, 2016.

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

HADDOW, A.D. et al. Genetic characterization of Zika virus strains: geographic expansion of the Asian lineage. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 2, p. e147, 2012.

HAYES, C.E. et al. The immunological functions of vitamin D endocrine system. **Cell Mol Biol**, v. 49, p.277-300, 2003.

HAYES, C. E.; DONALD ACHESON, E. A unifying multiple sclerosis etiology linking virus infection, sunlight, and vitamin D, through viral interleukin-10. **Medical Hypotheses**, v. 71, n. 1, p. 85–90, 2008.

HAUG, C. et al. Subnormal Serum Concentration of 1,25-Vitamin D in Human Immunodeficiency Virus Infection: Correlation with Degree of Immune Deficiency and Survival. **J of Infect Dis**, v. 169, n. 4, p. 889–893, 1994.

HAUSSLER, M.R.; MCCAIN, T.A. Basic and clinical concepts related to vitamin D metabolism and action (second of two parts). **N Engl J Med**, v. 297, p. 1041-50, 1977.

HENNESSEY, M.; FISCHER, M.; STAPLES, J.E. Zika Virus Spreads to New Areas — Region of the Americas, May 2015–January 2016. **Am J Transplant**, v. 16, p. 1031–1034, 2016.

HENRY, H.L. The 25(OH)D(3)/1alpha,25(OH)(2)D(3)-24R hydroxylase: a catabolic or biosynthetic enzyme? **Steroids**, v. 66, p. 391-8, 2001.

HE WISON, M. Vitamin D and the intracrinology of innate immunity. **Mol Cell Endocrinol**. v. 321 , n. 2, p. 103-11, 2010.

HOLICK, M.F. Vitamin D: Photobiology, metabolism, and clinical applications. **In: de GrootLC**, ed. Endocrinology, p. 990-1011, 1995.

HOLICK, M.F. Vitamin D deficiency. **N Eng J Med**.v. 357, n. 3, p. 266-81, 2007.

HOLICK, M.F. Vitamin D: a D-Lightful health perspective. **Nutr Rev**. v. 66, 10 Suppl2, p. S182-94, 2008.

HOLICK, M.F. et al. Evaluation, treatment, and prevention of vitamin D deficiency: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. **J Clin Endocrinol Metab**, v. 96, n. 7, p. 1911-1930, 2011.

HONÓRIO, N.A. et al. The spatial distribution of *Aedes aegypti* and *Aedes albopictus* in a transition zone, Rio de Janeiro, Brazil. **Cad Saúde Pública**, v. 25, p. 1203-14, 2009.

HUOTARI, A.; HERZIG, K.H. Vitamin D and living in northern latitudes an endemic risk area for vitamin D deficiency. **Int J Circumpolar Health**. v. 67, n. 2-3, p. 164-178, 2008.

IOOS, S. et al. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. **Medecine et Maladies Infectieuses**, v. 44, n. 7, p. 302–307, 2014.

JALLER RAAD, J. et al. Clinical profile of patients infected with the chikungunya virus in a Colombian Caribbean population. **Revista Colombiana de Reumatología (English Edition)**, v. 23, n. 3, p. 170–176, 2016.

JAVELLE, E. et al. Specific Management of Post-Chikungunya Rheumatic Disorders: A Retrospective Study of 159 Cases in Reunion Island from 2006-2012. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 3, p. .0003603, 2015.

JOUBERT, J.J. et al. Prevalence of hepatitis virus and some arbovirus infections in Kavango, northern SWA/ Namibia. **S Afr Med J**, v. 67, p. 500–02, 1985.

KAM, Y-W. et al. Longitudinal analysis of the human antibody response to chikungunya virus infection: implications for serodiagnosis and vaccine development. **J Virol**, v. 86, p. 13005-15, 2012.

KATO, S. The function of vitamin D receptor in vitamin D action. **J Biochem**, v. 127, p. 717-22, 2000.

KITSON, M. T. et al. Vitamin D status does not predict sustained virologic response or fibrosis stage in chronic hepatitis C genotype 1 infection. **Journal of Hepatology**, v. 58, n. 3, p. 467–472, 2013.

KULIE, T. et al. Vitamin D: An Evidence –Based Review. **J Am Board Fam Med**, v. 22, n. 6, p. 698-706. 2009.

KUNO, G.; CHANG, G.J. Full-length sequencing and genomic characterization of Bagaza, Kedougou, and Zika viruses. **Arch Virol**, v. 152, p. 687-96, 2007.

LABADIE, K. et al. Chikungunya disease in nonhuman primates involves long-term viral persistence in macrophages. **J Clin Invest**, v. 120, p. 894–906, 2010.

LANGE, C.M. et al. Vitamin D deficiency and a CYP27B1-1260 promoter polymorphism are associated with chronic hepatitis C and poor response to interferon-alpha based therapy. **Journal of Hepatology**, v. 54 n. 5, p. 887-893, 2011.

LEVINE, M.A. Normal Mineral homeostasis – Interplay of Parathyroid Hormone and Vitamin D, **Vitamin D and Rickets**, v. 6, p. 14- 33, 2003.

LIU, P.T. et al. Toll-like receptor triggering of a vitamin D-mediated human antimicrobial response. **Science**, v. 311, p. 1770-3, 2006.

LOKE, H. et al. Susceptibility to dengue hemorrhagic fever in Vietnam: Evidence of an association with variation in the vitamin D receptor and FC'Y receptor IIA genes. **Am J. Trop. Med**, v. 67, n. 1, p. 102-106, 2002.

LOPES, N.; NOZAWA, C.; LINHARES, R.E.C. Características gerais e epidemiologia dos arbovírus emergentes no Brasil. **Revista Pan-Amaz Saúde**, v. 5, n. 3, p. 55-64, 2014.

MARQUES, C.D.L. et al. The importance of vitamin D levels in autoimmune diseases. **Rev. Bras. Reumatol**, v. 50, n. 1, p. 67-80, 2010.

MAEDA, S.S. et al. Recomendações da Sociedade Brasileira de Endocrinologia e Metabologia (SBEM) para o diagnóstico e tratamento da hipovitaminose D. **Arq Bras Endocrinol Metab**, v. 58, n. 5, 2014.

MERLINO, L.A. et al. Vitamin D intake is inversely associated with rheumatoid arthritis: results from the Iowa Women's Health Study. **Arthritis Rheum**, v. 50, p. 72–7, 2004.
Metabolism of Vitamin D. Disponível em: <http://www.uptodate.com>, consultado em 13-02-2017.

MINER, J.J. et al. Brief report: chikungunya viral arthritis in the United States: a mimic of seronegative rheumatoid arthritis. **Arthritis Rheumatol**, v. 67, p. 1214–20, 2015.

MS - Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico. 2016. Disponível em: portalsaude.saude.gov.br/, consultado em 13-02-2017.

MITHAL, A. et al. IOF Committee of Scientific Advisors (CSA) Nutrition Working Group. Global vitamin D status and determinants of hypovitaminosis D. **Osteoporos Int**. v. 20, n. 11, p.180720, 2009.

MLAKAR, J. et al. Zika Virus Associated with Microcephaly. **N Engl J Med.** v. 374, p. 951-8, 2016.

MONTICIELO, O.A. Estudo dos polimorfismos Bsm1 e Fok1 do receptor da vitamina D e avaliação dos níveis séricos da 25-hidroxi vitamina D em pacientes com Lúpus Eritematoso Sistêmico. Tese de Doutorado - Universidade Federal do Rio Grande do Sul. Faculdade de Medicina. Programa de pós-graduação em medicina: Ciências Médicas. Porto Alegre, BR, 2011.

MORRISON, N.A. et al. Contribution of trans- acting factor alleles to normal physiological variability: vitamin D receptor gene polymorphism and circulating osteocalcin. **Proc Natl Acad Sci USA.** v. 89, n. 15, p. 6665-9, 1992.

MULLER, K. et al. The role of monocytes and T cells in 1,25- dihydroxy D3 mediated inhibition of B cell function in vitro. **Immunopharmacol.** v. 21, p. 1218, 1991.

MUSSO, D. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. **Emerg Infect Dis,** v. 21, n. 10, p. 1887, 2015.

MUSSO, D. et al. Detection of Zika virus in saliva. **Journal of Clinical Virology,** v. 68, p. 53–55, 2015.

MUSSO, D; GUBLER DJ. Zika vírus. **Clin Microbiol Rev,** v. 29, p. 487-524, 2016.

NASCI, R.S. Movement of Chikungunya virus into the Western Hemisphere. **Emerg Infect Dis,** v. 20, p. 1394-5, 2014.

NORMAN, A.W. On becoming a molecular endocrinologist. **Steroids,** v. 66 , p. 129-36, 2001.

NORMAN, A.W. From vitamin D to hormone D: fundamentals of the vitamin D endocrine system essential for good health. **Am J Clin Nutr,** v. 88, p. 491S-9S, 2008.

NORMAN, A.W.; BOUILLON, R. Vitamin D nutritional policy needs a vision for the future. **Exp BiolMed (Maywood),** v. 235. n. 9, p. 103445, 2010.

OEHLER, E. et al. Zika virus infection complicated by Guillain-Barre syndrome-case report, French Polynesia, December 2013. **Euro surveillance : bulletin Européen sur les maladies transmissibles = European communicable disease bulletin**, v. 19, n. 9, 2014.

OLIVEIRA, N.M.P.; LEMOS, M.C. Papel da vitamina D na susceptibilidade para a Diabetes Mellitus tipo 1. Dissertação de mestrado, Faculdade de Ciências da Saúde, Universidade da Beira Interior – **Covilhã**- Portugal. 2010.

OMDAHL, J.L. et al. Overview of regulatory cytochrome P450 enzymes of the vitamin D pathway. **Steroids**, v. 66, p. 381-9, 2001.

PAHO/WHO - Pan American Health Organization/World Health Organization. Number of reported cases of chikungunya fever in the Americas. 2015. Disponível em: paho.org/chikungunya consultado a 13-02-2017.

PANCHAUD, A. et al. M. Emerging role of zika virus in adverse fetal and neonatal outcomes. **Clin Microbiol Rev**, v. 29, p. 659-94. 2016

PARDIGON, N. The biology of chikungunya: A brief review of what we still do not know, **Pathologie Biologie**, n.57, p. 127-132, 2008.

PATTERSON, J.; SAMMON, M.; GARG, M. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. **The Western Journal of Emergency Medicine**, v. 17, n. 6, p. 671–679, 2016.

PETERLIK, M.; CROSS, H.S. Vitamin D and calcium deficits predispose for multiple chronic diseases. **Eur J Clin Invest**, v. 35, n. 5, p. 290-304, 2005.

PETERS, B.S.E.; MARTINI, L.A. Funções Plenamente Reconhecidas de Nutrientes - Vitamina D. ILSI - **International Life Sciences Institute of Brazil**. 2a ed. 2014.

PLUDOWSKI, P. et al. Vitamin D effects on musculoskeletal health, immunity, autoimmunity, cardiovascular disease, cancer, fertility, pregnancy, dementia and mortality-A review of recent evidence. **Autoimmunity Reviews**, v. 12, n. 10, p. 976–989, 2013.

POWERS, A.M.; LOGUE, C.H. Changing patterns of chikungunya virus: re-emergence of a zoonotic arbovirus. **Journal of General Virology**, v. 88, n. 9, p. 2363-2377, 2007.

PREMAOR, M.O.; FURLANETTO, T.W. Hipovitaminose D em adultos: Entendendo melhor a apresentação de uma velha doença. **Arquivo Brasileiro de Endocrinologia**, v. 50, n. 1, p. 25-37, 2006.

PROSSER, D.E.; JONES, G. Enzymes involved in the activation and inactivation of vitamin D. **Trends Biochem Sci**, v. 29, p. 664-73, 2004.

REDDY, V. et al. Correlation of plasma viral loads and presence of Chikungunya IgM antibodies with cytokine/ chemokine levels during acute chikungunya virus infection. **J Med Virol**, v. 86, p. 1393–401, 2014.

ROBINSON, M.C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952–53. I. Clinical features. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49, p. 28–32, 1955.

RODRIGUEZ-MORALES AJ. Zika: the new arbovirus threat for Latin America. **J Infect Dev Ctries**, v. 9, p. 684-5, 2015.

SABETTA, J.R. et al. Serum 25-hydroxyvitamin D and the incidence of acute viral respiratory tract infections in healthy adults. **PLoS One**. 2010;5:11088.

SCANDAR, S.A.S. Febre de Chikungunya “Aqueles que se doeram”. **Informativo SUCEN – SES SP**. Vector número 11, março de 2012.

SCHLEICHER, R.L. et al. Clinical Applications for Vitamin D Assays: What Is Known and What Is Wished for. **Clinical Chemistry**, v. 57, n. 9, p. 1227–1232, 2011.

SEYMOUR, R.L. et al. A rodent model of chikungunya virus infection in RAG1 ^{-/-} mice, with features of persistence, for vaccine safety evaluation. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 9, p. e0003800, 2015.

SILVA, M.E. et al. Vitamin D overload and experimental Trypanosoma Cruzi Infection. Parasitological and Histopathological aspects. **Comp Biochem Physiol**, v. 104, p. 175-81, 1993.

SIMON, F. et al. Chikungunya: A paradigm of Emergence and Globalization of Vector-Borne Disease, **Medical Clinics of North America**, v.92, n.6, p.1323-1343, 2008.

SIMPSON, D.I. Zika virus infection in man. **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 58, p. 335-8, 1964.

SLAVOV, S. et al. Overview of Zika virus (ZIKV) infection in regards to the Brazilian epidemic. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 49, n. 5, p. e5420, 2016.

SMOLDERS, J. et al. Vitamin D as an immune modulator in multiplesclerosis, a review. **J Neuroimmunol**, v. 194, p. 7–17. 2008

STAMP, T.C.B. Intestinal absorption of 25-hydroxycholecalciferol. **Lancet**, v. 2, n. 7873, p. 121-3, 1974.

STAPLES J.E.; BREIMAN, R.F.; POWERS, A.M. Chikungunya Fever: An Epidemiological Review of a Re-Emerging Infectious Disease. **Clinical Infectious Diseases**, v. 49, p. 942–8, 2009.

TENG, T-S. et al. A systematic meta-analysis of immune signatures in patients with acute chikungunya virus infection. **J Infect Dis**, v. 211, p. 1925–35, 2015.

THIBERVILLE, S.D.. et al. Chikungunya fever: epidemiology, clinical syndrome, pathogenesis and therapy. **Antiviral Res**, v. 99, n. 3, p. 345–70, 2013.

THORNE-LYMAN, A.; FAWZI, W.W. Vitamin D during pregnancy and maternal, neonatal and infant health outcomes: a systematic review and meta-analysis. **Paediatr Perinat Epidemiol**, v.26, n. 1, p. 75-90, 2012.

UJVARI, S.C. Pandemias: a humanidade em risco – **Capítulo: Um vírus vindo do oriente**. Editora Contexto, p. 53-68, 2014.

URASHIMA, M. et al. Randomized trial of vitamin D supplementation to prevent seasonal influenza A in schoolchildren 1 – 3. **American Journal of Clinical Nutrition**, v. 91, n. 2, p. 1255–1260, 2010.

VALDIVIELSO, J.M.; FERNANDEZ, E. Vitamin D receptor polymorphisms and diseases. Elsevier. **Clinica Chimica Acta**, v. 371, p. 1-12, 2006.

VANCHINATHA, V.; LIM, H.W. A dermatologist's perspective on Vitamin D, **Mayo Clin. Proc.**, v. 87, n. 4, p. 372-380, 2012.

VAN GENDEREN, F.T. et al. First Chikungunya Outbreak in Suriname; Clinical and Epidemiological Features. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 10, n. 4, p. 1–18, 2016.

VAN LEEUWEN, J.P. et al. 24,25-Dihydroxyvitamin D(3) and bone metabolism. **Steroids**, v. 66, p. 375-80, 2001.

VERBOVEN, C. et al. A structural basis for the unique binding features of the human vitamin D-binding protein. **Nat Struct Biol**, v. 9, p. 131-6, 2002.

VIASUS, D.; DE LA HOZ, J.M. Qué tanto impacto tiene La infección por El virus de Chikungunya? **Salud Uninorte**, v. 31, n. 1, p. 7-9, 2015.

VIETH, R. et al. The urgent need to recommend an intake of vitamin D that is effective. **Am J Clin Nutr**, v. 85, n. 3, p. 649-50, 2007.

VILLAR, L.M. et al. Association between vitamin D and hepatitis C virus infection: a meta-analysis. **World journal of gastroenterology : WJG**, v. 19, n. 35, p. 5917–24, 2013.

WANG, T.T. et al. Large-scale in silico and microarray-based identification of 1,25 dihydroxyvitamin D3 target genes. **Mol Endocrinol**, v. 11, p. 2685-95, 2005.

WATKINS, R.R.; LEMONOVICH, T.L.; SALATA, R.A. An update on the association of vitamin D deficiency with common infectious diseases. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v. 93, n. 5, p. 363–368, 2015.

WIELANEK, A.C. et al. Guillain-barre syndrome complicating a chikungunya virus infection. **Neurology**, v. 69, p. 2105–07, 2007

WÖHRLE, S. et al. FGF receptors control vitamin D and phosphate homeostasis by mediating renal FGF23 signaling and regulating FGF23 expression in bone. **J Bone Miner Res**, v. 26, n. 10, p. 2486-97, 2011.

XU, H. et al. 1,25 Dihydroxyvitamin D3 exerts opposing effects to IL-4 on MHC class II antigen expression, accessory activity, and phagocytosis of human monocytes. **Scand J Immunol**, v. 38, p. 535-40, 1993.

YAMADA, S. et al. Three dimensional structure function relationship of vitamin D and vitamin D receptor model. **Steroids**, v. 66, n. 3-5, p. 177-87, 2001.

YOUNG, G.A.; Jr, UUNDERDAHL, N.R.; CARPENTER, L.E. Vitamin D intake and susceptibility of mice to experimental swine influenza virus infection. **Proc Soc Exp Biol Med**, v. 72, p. 695-697, 1949.

ZANLUCA, C. et al. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Mem Inst Oswaldo Cruz**, v. 110, p. 569-72, 2015.