

FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO AGGEU MAGALHÃES
MESTRADO EM BIOCÊNCIAS E BIOTECNOLOGIA EM SAÚDE

MAURO CÉSAR DA SILVA

PERFIL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MEMÓRIA EM PACIENTES COM
HISTÓRICO DE NEUROARBOVIROSE E SEU COMUNICANTE
INTRADOMICILIAR, NÃO GENETICAMENTE RELACIONADO, FRENTE AO
DESAFIO COM ANTÍGENOS DE ARBOVÍRUS (DENV, ZIKV E CHIKV)

RECIFE

2021

MAURO CÉSAR DA SILVA

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MEMÓRIA EM PACIENTES COM
HISTÓRICO DE NEUROARBOVIROSE E SEU COMUNICANTE
INTRADOMICILIAR, NÃO GENETICAMENTE RELACIONADO, FRENTE AO
DESAFIO COM ANTÍGENOS DE ARBOVÍRUS (DENV, ZIKV E CHIKV)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biociências e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Orientadora: Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

RECIFE

2021

**Catálogo na fonte: Biblioteca Luciana Borges Abrantes dos Santos
Instituto Aggeu Magalhães / Fundação Oswaldo Cruz**

- S586p Silva, Mauro César da.
Perfil da resposta imunológica de memória em pacientes com histórico de neuroarbovirose e seu comunicante intradomiciliar, não geneticamente relacionado, frente ao desafio com antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) / Mauro César da Silva. — Recife: [s.n.], 2021.
115 p. : il., graf., tab. ; 30 cm.
- Dissertação (mestrado) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.
Orientadora: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva.
Programa de Pós-graduação em Biociências e Biotecnologia em Saúde.
1. Vírus da Dengue - imunologia. 2. Zika virus - imunologia. 3. Vírus Chikungunya - imunologia. 4. Antígenos Virais - imunologia. 5. Leucócitos Mononucleares - sangue. 6. Técnicas In Vitro. 7. Síndrome de Guillain-Barré - complicações. 8. Encefalite por Arbovirus - complicações. 9. Memória Imunológica. 10. Ensaio de Imunoabsorção Enzimática - métodos. I. Silva, Norma Lucena Cavalcanti Licínio da. II. Título.

MAURO CÉSAR DA SILVA

**PERFIL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MEMÓRIA EM PACIENTES COM
HISTÓRICO DE NEUROARBOVIROSE E SEU COMUNICANTE
INTRADOMICILIAR, NÃO GENETICAMENTE RELACIONADO, FRENTE AO
DESAFIO COM ANTÍGENOS DE ARBOVÍRUS (DENV, ZIKV E CHIKV)**

Dissertação apresentada ao Mestrado em
Biotecnologia e Biotecnologia em Saúde do
Instituto Aggeu Magalhães, Fundação
Oswaldo Cruz para obtenção do grau de
Mestre em Ciências.

Aprovado em: 30/06/2021

BANCA EXAMINADORA

Dr^a. Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a. Sheilla Andrade de Oliveira
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

Dr^a. Marli Tenório Cordeiro
Instituto Aggeu Magalhães/Fundação Oswaldo Cruz

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter permitido minha chegada até aqui, me dando saúde, coragem e calma para superar todos os obstáculos encontrados ao longo dessa trajetória.

À minha orientadora dra Norma Lucena, pela confiança, ensinamentos e por toda dedicação, mesmo em meio a dias tão desgastantes. Que a gente continue nossa parceria contemplando a beleza mutável da imunologia.

A todos os integrantes do Laboratório de Imunogenética: Thailany Gomes, Neila Caroline, João Lucas, Katherine Aquino, Camila Rodrigues, Andreza Pâmela, Sávio Vieira, Jair Figueredo e Fernanda Medeiros. Em especial a Renata Almeida, que mesmo não estando mais vinculada ao grupo se fez presente para que esse trabalho fosse possível, obrigado por todo conhecimento compartilhado.

Aos doutores Paulin Sonon e Eduardo Donadi, por todo suporte na realização dos experimentos na Faculdade de Medicina da USP de Ribeirão Preto.

Aos funcionários e professores do PPGBBS por toda dedicação. E a CAPES pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desse estudo.

À Rossana Santos, um dos meus maiores exemplos de força e competência. Obrigado por ser abrigo/oásis nas piores fases e por transformar tudo com sua energia linda. Te amo absurdos e estarei por você sempre.

À Thailany Gomes, Neila Caroline e Renan Garcia, pela amizade, conselhos, carinho e companheirismo compartilhados diariamente.

Aos amigos que caminharam no mestrado comigo: Rennatha Albuquerque e João Lucas, sem vocês teria sido tudo mais difícil, gratidão pelo suporte nos momentos sufocantes.

Aos amigos/amores que somei ao longo da vida: João Oliveira, Ramon Vinícius, Pedro Gabriel, Thais Farias, Isabella Benigno, Luiza Mabel, Elisabete Deyse, Renata Pessôa, Anderson Silva e Wedny Santana. Por todos os momentos lindos que compartilhamos e compartilharemos.

A Richard Fernandes, pelo companheirismo e incentivo em meio aos estresses diários, e por toda paciência e suporte na formatação deste trabalho.

À minha família, em especial minha mãe Maria José, irmã Natália Maria e minha tia Marineide Raimundo por serem minha base desde sempre.

“Aceitara a incerteza, e lidava com os componentes da incerteza com uma concentração de quem examina através das lentes de um microscópio” – Miopia Progressiva

Clarice Lispector

SILVA, Mauro César da. **Perfil da resposta imunológica de memória em pacientes com histórico de neuroarbovirose e seu comunicante intradomiciliar, não geneticamente relacionado, frente ao desafio com antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV).** 2021. Dissertação (Mestrado em Biociências e Biotecnologia em Saúde) – Instituto Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Recife, 2021.

RESUMO

Os mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis pela cocirculação dos vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV). Esses arbovírus, quando sintomáticos, podem promover nos indivíduos infectados um amplo espectro de síndromes clínicas, incluindo doenças neuroinvasivas, como a encefalite e a síndrome de Guillain-Barré (SGB). O mecanismo de patogênese das neuroarboviroses é complexo e ainda não foi completamente esclarecido o papel dos mediadores solúveis na patogênese da doença. Diante disso, tivemos como objetivo compreender a resposta imunológica de memória nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com histórico de neuroarbovirose e seu comunicante intradomiciliar (cônjuge), frente ao desafio com antígenos de arbovírus. A população de estudo foi composta por 16 pacientes maiores de 18 anos, que tiveram diagnóstico clínico e laboratorial de neuroarbovirose (seis de encefalite e 10 de SGB) atendidos no Setor de Neurologia do Hospital da Restauração (HR), Recife, Pernambuco e seu respectivo cônjuge. As PBMCs dos pacientes e comunicantes foram cultivadas e desafiadas com os antígenos de DENV, CHIKV e ZIKV; os mediadores solúveis foram quantificados com o kit Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel; e um ELISA do tipo sanduíche foi realizado para mensurar os níveis de HLA-G solúvel. Observamos que o perfil de expressão dos mediadores solúveis da resposta imunológica varia de acordo com o agente infeccioso, que influencia na apresentação clínica da doença; onde os antígenos de CHIKV apresentaram uma maior antigenicidade. Além disso, também foi constatado que a encefalite está associada a expressão exacerbada dos mediadores solúveis, possivelmente devido a fatores genéticos que tornam esses indivíduos extremamente responsivos a antígenos e a uma menor eficiência na resposta antiviral, que foi comprovada no sobrenadante de PBMCs dos comunicantes que apresentaram aumento de IL-15 em relação as PBMCs dos pacientes com histórico de encefalite.

Palavras-chave: resposta imunológica; neuroarbovirose; ensaio in vitro; Dengue; Zika, chikungunya.

SILVA, Mauro César da. **Profile of the immune memory response in patients with a history of neuroarbovirus infection and their non-genetically related home communicant, facing the challenge with arbovirus antigens (DENV, ZIKV e CHIKV)**. 2021. Dissertation (Master in Biosciences and Biotechnology in Health) – Aggeu Magalhães Institute, Oswaldo Cruz Foundation, Recife, 2021.

ABSTRACT

Mosquitoes of the *Aedes* genus are responsible for the cocirculation of dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) viruses. These arboviruses, when symptomatic, can promote a wide spectrum of clinical syndromes in infected individuals, including neuroinvasive diseases such as encephalitis and Guillain-Barré syndrome (GBS). The mechanism of pathogenesis of neuroarboviruses is complex and the role of soluble mediators in the pathogenesis of the disease has not been completely clarified. Therefore, we aimed to understand the memory immune response in peripheral blood mononuclear cells of patients with a history of neuroarbovirosis and their household contact (spouse), facing the challenge with arbovirus antigens. The study population consisted of 16 patients over 18 years of age, who had a clinical and laboratory diagnosis of neuroarbovirus (6 encephalitis and 10 GBS) treated at the Neurology Sector of Hospital da Restauração (HR), Recife, Pernambuco and its respective spouse. PBMCs from patients and contacts were cultured and challenged with DENV, CHIKV and ZIKV antigens; soluble mediators were quantified with the Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel kit; and a sandwich-type ELISA was performed to measure soluble HLA-G levels. We observed that the expression profile of soluble immune response mediators varies according to the infectious agent, which influences the clinical presentation of the disease, where CHIKV antigens showed greater antigenicity. In addition, encephalitis was also found to be associated with exacerbated expression of soluble mediators, possibly due to genetic factors that make these individuals extremely responsive to antigens and to a lower efficiency in the antiviral response, which was proven in the PBMC supernatant of contacts that showed an increase in IL-15 compared to the PBMCs of patients with a history of encephalitis.

Keywords: immune response; neuroarbovirus; in vitro assay; Dengue; Zika; chikungunya.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de replicativo dos Flavivírus	25
Figura 2 - Maturação dos Flavivírus	26
Figura 3 - Transmissão e manifestações clínicas do ZIKV	27
Figura 4 - Vírion e organização genômica dos vírus pertencentes à família Togaviridae (CHIKV)	29
Figura 5 - Ciclo replicativo dos alfavírus	30
Figura 6 - Resposta imunológica inespecífica de antígenos de MOCK	51
Figura 7 - Resposta imunológica de memória em cultura de células mononucleares de pacientes com histórico de neuroarbovirose desafiadas com antígenos dos arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV)	53
Figura 8 - Perfil inflamatório considerando apenas o diagnóstico neurológico sob estímulo de ZIKV	55
Figura 9 - Perfil inflamatório considerando apenas o diagnóstico neurológico sob estímulo de CHIKV	56
Figura 10 - Perfil inflamatório considerando diagnóstico neurológico secundário à infecção por arbovírus sob estímulo de ZIKV	57
Figura 11 - Perfil inflamatório considerando diagnóstico neurológico secundário à infecção por arbovírus sob estímulo de CHIKV	59
Figura 12 - Perfil imunológico de pacientes com histórico de neuroarbovirose em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulo de ZIKV	62

Figura 13 - Perfil imunológico de pacientes com histórico de encefalite, secundária a infecção por arbovírus, em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulos de ZIKV e CHIKV	63
Figura 14 - Perfil imunológico de pacientes com histórico de SGB, secundária a infecção por arbovírus, em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulos de ZIKV e CHIKV	63
Figura 15 - Estudo de correlação dos mediadores solúveis expostos em PBMCs de pacientes com histórico de encefalite e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de ZIKV.....	64
Figura 16 - Estudo de correlação dos mediadores solúveis expostos em PBMCs de pacientes com histórico de encefalite e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de CHIKV.....	65
Figura 17 - Estudo de correlação dos mediadores solúveis expostos em PBMCs de pacientes com histórico de SGB e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de ZIKV.....	66
Figura 18 - Estudo de correlação dos mediadores solúveis expostos em PBMCs de pacientes com histórico de SGB e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de CHIKV.....	67

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AXL – Anexelekto
BHE – Barreira hematoencefálica
BPL - Betapropiolactona
C – Capsídeo
CDs – Células dendríticas
CHIKV – Vírus da Chikungunya
DENV – Vírus da Dengue
E – Envelope
ECSA – Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano
ELISA – Ensaio imunoenzimático
FGF – Fator de crescimento de Fibroblasto
HLA-G – Antígeno leucocitário humano – G
HR – Hospital da Restauração
HSV-1 – Vírus herpes simples 1
IFN- γ – Interferon gama
IgA – Imunoglobulina A
IgG – Imunoglobulina G
IgM – Imunoglobulina M
IIFT – Teste de imunofluorescência indireta
IL – Interleucina
IOL – Asiático e Oceano Índico
IP-10 – Proteína 10 induzida por Interferon gama
LAVITE – Laboratório de Virologia e Tecnologia Experimental
LCR – Líquido cefalorraquidiano
MCP-1 – Proteína quimiotática de monócitos 1
MIG – Monocina induzida por Interferon gama
MIP -1 α – Proteína inflamatória de macrófagos 1 alfa
NK – Natural killers
NS – Não-estrutural
OMS – Organização Mundial de Saúde
OPAS – Organização Pan-Americana da Saúde
ORF – Fase aberta de leitura

PBMC – Células mononucleares do sangue periférico
PHA – Fitohemaglutinina
prM – pré-membrana
PRNT - Teste de neutralização por redução de placas
RABV – Vírus da raiva
RE – Retículo endoplasmático
RNA – Ácido ribonucléico
RPM – Rotações por minuto
RT-PCR – Reação da transcriptase reversa seguida da reação em cadeia da polimerase
SE – Semana epidemiológica
SGB – Síndrome de Guillain-Barré
SNC – Sistema nervoso central
TCLE – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TGN – Rede trans-Golgi
TJP – Proteínas de junção apertada
TMB5 - Tetrametilbenzidina super sensitive
TNF- α – Fator de necrose tumoral alfa
VEGF – Fator de crescimento endotelial vascular
ZIKV – Vírus da Zika

SUMÁRIO

1	REFERENCIAL TEÓRICO.....	14
1.1	Histórico das arboviroses no Brasil.....	14
1.1.1	Zika	14
1.1.2	Dengue	15
1.1.3	Chikungunya.....	17
1.2	Diagnóstico etiológico das arboviroses.....	18
1.2.1	Aspectos clínicos e diagnóstico de ZIKA	18
1.2.2	Aspectos clínicos e diagnóstico da Dengue.....	20
1.2.3	Aspectos clínicos e diagnóstico de Chikungunya	22
1.3	Patogenia das arboviroses e evolução para neuroarbovirose.....	23
1.3.1	Patogênese ZIKV e DENV	24
1.3.2	Patogênese do CHIKV	28
1.3.3	Neuroarbovirose	30
1.3.4	Mediadores solúveis da inflamação nas neuroarboviroses.....	34
2	JUSTIFICATIVA.....	37
3	HIPÓTESE	39
4	OBJETIVOS	40
4.1	Objetivo Geral	40
4.2	Objetivos Específicos.....	40
5	MATERIAIS E MÉTODOS	41
5.1	Considerações éticas.....	41
5.2	Tipo, local de estudo e coleta de amostra.....	41
5.3	Cultura de células PBMCs para estímulo	42
5.4	Níveis de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento	44
5.5	Níveis de HLA-G solúvel (HLA-Gs).....	47
5.6	Análise Estatística	48
6	RESULTADOS.....	49
6.1	Perfil da população de estudo.....	49
6.2	Influência do antígeno normal (MOCK) sobre o perfil de expressão dos mediadores	49
6.3	Resposta imunológica de memória de pacientes com histórico de neuroarbovirose a antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV)	52

6.4	Perfil imunológico de memória de pacientes de acordo com a síndrome neurológica secundária à arbovirose.....	54
6.5	Proporção entre a mediana dos níveis de mediadores imunológicos solúveis induzidos nas PBMCs de pacientes com histórico de neuroarbovirose submetidas a diferentes estímulos antigênicos (MOCK, ZIKV e CHIKV)	59
6.6	Perfil imunológico de pacientes com histórico de neuroarbovirose em relação ao seu comunicante intradomiciliar	62
6.7	Correlações dos mediadores imunológicos solúveis induzidos nas PBMCs de pacientes com histórico de neuroarbovirose e seus comunicantes, submetidas a diferentes estímulos antigênicos (ZIKV e CHIKV)	64
7	DISCUSSÃO	68
8	CONCLUSÃO	74
	REFERÊNCIAS.....	75
	APÊNDICE A – TERMOS DE CONSENTIMENTO E LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)	82
	APÊNDICE B – TABELA DE PROPORÇÃO DOS MEDIADORES SOLÚVEIS – SGB	86
	APÊNDICE C – TABELA DE PROPORÇÃO DOS MEDIADORES SOLÚVEIS – ENC	87
	APÊNDICE D – ARTIGO	89
	ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IAM.....	111

1 REFERENCIAL TEÓRICO

Nas subseções seguintes, os fundamentos teóricos usados na formulação da pergunta condutora desta dissertação foram delineados.

1.1 Histórico das arboviroses no Brasil

As arboviroses, causadas pelos arbovírus (do inglês - *Arthropod-borne virus*) transmitidas por espécies de mosquito do gênero *Aedes*, particularmente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, têm se caracterizado como um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Nas Américas, esses vetores são responsáveis pela cocirculação dos vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV), e da febre amarela, apresentando um extenso histórico desafiador para a assistência e vigilância da saúde populacional (BRASIL, 2019; SALLES et al., 2018).

1.1.1 Zika

Em 1947, durante um estudo sobre a transmissão da febre amarela, na Floresta Zika (Uganda), o ZIKV foi isolado pela primeira vez a partir do soro de macaco Rhesus. O ZIKV pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*, semelhante ao DENV e ao vírus da febre amarela. A ocorrência de infecção humana foi evidenciada pela primeira vez através da presença de anticorpos neutralizantes no soro de residentes da África Oriental (BRASIL, 2019; DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952). Após esse fato, descrições esporádicas de ZIKV causando infecções em humanos foram descritas na África e Ásia (ZANLUCA; DOS SANTOS, 2016). Em 2007, uma epidemia pelo ZIKV foi descrita nas Ilhas Yap, na Micronésia, seguida de surtos na Oceania em 2013-14. Assim sendo, até o momento, são conhecidas e descritas duas linhagens do ZIKV: uma africana e outra asiática (DUFFY et al., 2009; HADDOW, et al., 2012; MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014).

Em 2015, o ZIKV foi identificado pela primeira vez no continente americano, também transmitido pelo vetor *Aedes aegypti*. Os primeiros casos foram registrados na região Nordeste do Brasil e, desde então, disseminou-se para todo o país e

demais países do continente americano, com exceção do Chile e do Canadá (BRASIL, 2019). Nesse cenário do Brasil de 2015, o número de casos de gestantes com fetos apresentando complicações neurológicas, principalmente microcefalia, detectadas ainda durante a gravidez aumentou significativamente (SCHULER-FACCINI, et al., 2016). Além dos casos de microcefalia, casos de síndrome de Guillain-Barré começaram a ser descritos no Brasil em maio de 2015. Na vigência desse surto da doença no estado do Rio Grande do Norte, foram diagnosticados sete casos de Síndrome de Guillain-Barré, precedidos por sintomas febris compatíveis com infecção por ZIKV, porém sem confirmação laboratorial (VAN DOORN; RUTS; JACOBS, 2008; WILLISON; JACOBS; VAN DOORN, 2016). Em Pernambuco, outros seis casos com complicações neurológicas associados ao ZIKV foram descritos, quatro casos de Guillain-Barré e dois de encefalomielite aguda disseminada (ADEM), com um caso confirmado por análise de soro e cinco casos usando fluido cerebrospinal (ARAUJO; FERREIRA; NASCIMENTO, 2016).

Em fevereiro de 2016, a Organização Mundial de Saúde (OMS) declarou como "Emergência de Saúde Pública de Preocupação Internacional" o aparecimento de microcefalia congênita e Síndrome de Guillain-Barré nas Américas, relacionando essas patologias à infecção pelo ZIKV. Nos seres humanos, a infecção por ZIKV normalmente provoca doença leve e autolimitada conhecida como febre Zika (IOOS et al., 2014), a qual é acompanhada por exantema maculopapular, dor de cabeça, conjuntivite e mialgia. A doença grave que requer hospitalização é incomum, e as mortes são raras. Devido as infecções por DENV e CHIKV compartilharem a mesma distribuição geográfica do ZIKV, assim como sintomas semelhantes, os pacientes com suspeita de infecções por arbovírus devem ser avaliados e conduzidos de forma semelhante. Ainda nesse contexto, estima-se que 80% das pessoas que são infectadas com o ZIKV são assintomáticas (ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE et al., 2009).

1.1.2 Dengue

Os vírus da dengue são arbovírus pertencentes à família *Flaviviridae*, e ao gênero *Flavivirus*, e são representados por quatro sorotipos antigenicamente distintos (DENV-1 a 4), responsáveis por causar desde uma doença autolimitada leve até formas mais graves da doença, ou ainda a morte (NUNES et al., 2019). O

primeiro surto de dengue no mundo foi reportado em 1779 em Jacarta, na Indonésia; desde então, diversos surtos ocorreram e a doença é considerada uma ameaça à saúde pública associada a uma notável morbimortalidade (GUO et al., 2017). Isso ocorre devido ao fato de não existir uma terapia eficaz e efetiva para dengue, pois o tratamento é puramente sintomático, necessitando-se da assistência hospitalar de alta complexidade nos casos graves. A estimativa mundial é que 3 bilhões de pessoas estejam sob o risco de contrair a doença e que, anualmente, 390 milhões de pessoas sejam infectadas, alcançando cerca de 20 mil vítimas fatais (BRASIL, 2019; GOULD; SOLOMON, 2008; SALLES et al., 2018; WHITEHEAD et al., 2007).

A primeira referência à dengue no Brasil foi feita durante o período colonial, entretanto a primeira epidemia, documentada clínica e laboratorialmente, ocorreu entre 1981-1982, em Boa Vista/RO, sendo causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4. Em 1986, foram relatadas epidemias no estado do Rio de Janeiro e em algumas capitais da região Nordeste. No ano de 1990, o sorotipo DENV-2 foi introduzido no Rio de Janeiro, atingindo várias cidades do sudeste do Brasil. Posteriormente, nos anos 2000, também no Rio de Janeiro, o sorotipo DENV-3 foi isolado e uma nova epidemia de dengue ocorreu entre os anos de 2001-2003. Desde então, a dengue vem ocorrendo no país de forma endêmica, com surtos associados à alteração dos sorotipos circulantes ou à circulação em áreas antes indenes (NOGUEIRA et al., 1988; NOGUEIRA et al., 1993; OSANAI et al., 1983; SALLES et al., 2018; SCHATZMAYR, NOGUEIRA, ROSA, 1986).

Quanto aos aspectos endêmicos, essa arbovirose apresenta uma sazonalidade marcada, frequente em épocas quentes e chuvosas no Brasil. Entre 2002 e 2014, o panorama da dengue no Brasil foi caracterizado: pela circulação simultânea dos quatro sorotipos; pelo aumento no número de infectados e de hospitalizações, incluindo crianças; pelas epidemias de grande magnitude; e pelo aumento do número de óbitos. A curva histórica da doença permaneceu ascendente até o ano de 2016, com o recorde dos registros de casos no ano de 2015. Já no ano de 2017, houve uma redução de registro de casos da dengue, não obstante a dengue continua sendo a arbovirose mais prevalente nas Américas (BRASIL, 2019).

1.1.3 Chikungunya

O vírus chikungunya, por sua vez, pertence ao gênero *Alphavirus*, da família *Togaviridae* e possui quatro genótipos: Oeste Africano, Leste-Centro-Sul Africano (ECSA), Asiático e Oceano Índico (IOL). O CHIKV foi isolado em 1952, na Tanzânia, e as primeiras emergências documentadas ocorreram com a introdução do vírus no sudeste asiático e na Índia, instalando-se em um ciclo esporádico de transmissão urbano que perdura até hoje, tendo o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus* como principais vetores (BRASIL, 2019; HONÓRIO et al., 2015).

Esse vírus foi introduzido no continente americano em 2013, levando a uma onda epidêmica significativa em diversos países da América Central e ilhas do Caribe. A infecção nas Américas foi relatada em dezembro de 2013, quando a Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS) publicou um alerta epidemiológico sobre as evidências dos primeiros casos autóctones da doença; até a 52ª SE (semana epidemiológica) do ano de 2014 foram notificados 1.071.696 casos suspeitos da doença em mais de 30 países do continente americano, com 169 óbitos atribuídos à chikungunya. No Brasil, em 2014, foi verificado, por métodos laboratoriais, a presença do CHIKV nos estados do Amapá e da Bahia e desde então todas as Unidades da Federação registram a transmissão autóctone desse arbovírus. Entretanto, até o momento, foram detectadas apenas as linhagens asiáticas e ECSA no Brasil (BRASIL, 2019; ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE, 2013, 2014; SILVA et al., 2018).

A infecção por CHIKV induz uma síndrome febril de início súbito e debilitante; além disso, ocasiona uma intensa artralgia que afeta cerca de 80% dos infectados, persistindo por meses e até anos, podendo se tornar crônico. O quadro articular crônico interfere na qualidade de vida do indivíduo, causando impactos significativos na economia, já que o paciente tem a produtividade comprometida. Somado a esse fato, o CHIKV pode causar doença neurológica nos infectados, podendo ser fatal. O reflexo desse quadro clínico populacional é uma maior demanda por serviços de saúde e crescente necessidade de recursos financeiros e humanos, na tentativa de minimizar os efeitos da doença na sociedade (HONÓRIO et al., 2015; SILVA et al., 2018).

1.2 Diagnóstico etiológico das arboviroses

As arboviroses urbanas (DENV, ZIKV e CHIKV) compartilham diversos sinais clínicos semelhantes, dificultando a suspeita inicial pelo profissional de saúde e a adoção de manejo clínico adequado. Conseqüentemente, essas dificuldades podem predispor a ocorrência de formas graves das doenças, ocasionando, eventualmente, óbitos. Desse modo, é fundamental o diagnóstico laboratorial correto, para minimizar as chances de progressão da doença e também verificar os casos de coinfeção. Apesar dessas limitações, existem dois pilares para o diagnóstico diferencial: a detecção direta de patógenos e determinação indireta de marcadores específicos. Os testes sorológicos apresentam uma janela de diagnóstico mais longa do que os métodos diretos, sendo capazes de diagnosticar infecções agudas e passadas, tornando possível a vigilância de doenças e a monitoração da eficácia das vacinas existentes (BRASIL, 2019; OHST et al., 2018).

1.2.1 Aspectos clínicos e diagnóstico de ZIKA

Não existe um método único que seja capaz de diagnosticar, com precisão, infecções causadas pelo ZIKV durante todo o curso da doença, sendo então necessária a combinação de métodos de detecção diretos e indiretos. O diagnóstico diferencial do ZIKV carece da inclusão e da avaliação de DENV e CHIKV, devido às semelhanças clínicas e coendemicidade, sendo fundamental uma análise cuidadosa dos resultados, pois guiará o manejo clínico em relação à possibilidade de casos graves da doença (OHST et al., 2018).

Entre os métodos de detecção direta do ZIKV, existe o isolamento viral via cultura de células e/ou ensaios de transcrição reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase (RT-PCR, do inglês: *reverse-transcriptase polymerase chain reaction*). Esta técnica possibilita, de forma altamente específica, a detecção do ácido ribonucleico (RNA, do inglês: *ribonucleic acid*) do ZIKV em amostras de soro, saliva, urina, sêmen, líquido amniótico e leite materno. Esses experimentos só são viáveis na primeira semana, após o início dos sintomas; e, além disso, devido à curta fase virêmica, ao número elevado de infecções assintomáticas e à dificuldade de determinar com precisão a data de início dos sintomas, o uso da detecção direta do ZIKV é bastante limitada, podendo causar falsos negativos, requerendo então testes

sorológicos adicionais (CALVO et al., 2016; GORCHAKOV et al., 2019; OHST et al., 2018).

No que diz respeito aos métodos indiretos, a sorologia é a técnica mais aplicada, detectando infecções por ZIKV recentes e passadas. A detecção do anticorpo IgM anti-ZIKV, ou de um aumento significativo no título de IgG em amostras pareadas, são indicativos de uma infecção aguda. As infecções primárias por ZIKV ocorrem em indivíduos sem infecções prévias por flavivírus, levando-os à produção de anticorpos IgM anti-ZIKV no período de 4-7 dias, após o início da doença, alcançando o pico em duas semanas e permanecendo detectáveis por aproximadamente 12 semanas. Quando não há mais a produção de IgM, os anticorpos IgG anti-ZIKV aparecem, e a expectativa é que persistam por toda a vida. A maioria dos residentes de áreas endêmicas para o ZIKV já foi infectada por outros flavivírus como, por exemplo, o DENV. Nesses indivíduos, a infecção pelo ZIKV é secundária e geralmente desenvolvem elevados títulos de IgG anti-ZIKV logo após o início dos sintomas. Em paralelo a esse fato, há um aumento de IgG contra o vírus da infecção primária causada por outro flavivírus, enquanto que a produção de anticorpos IgM anti-ZIKV costuma ser baixa ou ausente (LANDRY; GEORGE, 2016; OHST et al., 2018; STEINHAGEN et al., 2016).

A limitação do diagnóstico sorológico deve-se à possibilidade de reação cruzada por meio da sorologia IgM entre o DENV e o ZIKV. Devido a isso, é necessário que as amostras sejam testadas em paralelo para as duas doenças e que seja realizada uma análise adicional com anticorpos IgG. Isso se justifica, pois, o objetivo é reduzir o número de falso-positivos e falso-negativos que ocorrem no cenário de infecções secundárias, mascarando infecções agudas. Destacando os testes mais utilizados, temos: o ensaio imunoenzimático (ELISA, do inglês: *enzyme-linked immunosorbent assay*), o teste de imunofluorescência indireta (IIFT, do inglês: *indirect immunofluorescence test*) e o teste de neutralização por redução de placas (PRNT, do inglês: *plaque-reduction neutralization*); todos esses estão suscetíveis à reação cruzada, pois a maioria baseia-se em antígenos de vírus inteiro ou glicoproteínas virais (BRASIL, 2019; OHST et al., 2018; PRIYAMVADA et al., 2016; SILVA; SPALDING, 2018).

Dentre essas glicoproteínas, estão as proteínas estruturais virais e a proteína E do envelope do ZIKV, cuja constituição tem mais de 50% de homologia com a proteína E do DENV. Por causa disso, há a indução de uma ampla reatividade

sorológica cruzada com outros flavivírus, tornando os dados inconclusivos ou falso-positivos em indivíduos previamente infectados ou vacinados contra um flavivírus relacionado. Com o intuito de reduzir a reatividade cruzada na sorologia de IgM, algumas tecnologias estão sendo desenvolvidas, como a inclusão de proteínas virais não-estruturais (NS) nos ensaios como NS1, NS3 e NS5 (OHST et al., 2018; PRIYAMVADA et al., 2016; SILVA, SPALDING, 2018).

As manifestações clínicas também ajudam no diagnóstico que pode variar de manifestações brandas e autolimitadas até complicações neurológicas e ainda malformações congênitas. Quando autolimitada, a doença tem duração de 4-7 dias, comumente associada as seguintes manifestações: febre baixa ($\leq 38,5^{\circ}\text{C}$) ou ausente, exantema (geralmente pruriginoso e maculopapular craniocaudal) de início precoce, conjuntivite não purulenta, artralrias, edema periarticular, cefaleia, linfonodomegalia, astenia e mialgia. As gestantes infectadas, mesmo assintomáticas, podem transmitir o vírus ao feto, podendo causar aborto espontâneo, óbito fetal ou malformações congênitas. É necessário ainda ter atenção aos casos de neuroarbovirose, onde há o aparecimento de quadros neurológicos, como a Síndrome de Guillain-Barré (SGB), encefalites, mielites e neurite óptica, entre outros (BRASIL, 2019; CORDEIRO et al., 2016).

1.2.2 Aspectos clínicos e diagnóstico da Dengue

O diagnóstico dos quatro sorotipos de DENV pode ser realizado através do isolamento do vírus, detecção de RNA ou antígeno viral, detecção de anticorpos específicos ou a combinação desses métodos diretos e indiretos, semelhante ao diagnóstico do ZIKV. Os métodos diretos incluem o isolamento do vírus e a detecção do RNA viral por RT-PCR; essas são as estratégias mais eficientes nos primeiros 4-5 dias após o início dos sintomas clínicos, que caracteriza a fase aguda da doença. Apesar de mais específico, a limitação dos métodos diretos se deve ao fato de requerer equipamentos, reagentes e profissionais habilitados para realização do exame. Esses fatores são somados à curta fase virêmica que, na maioria das vezes, inviabiliza a detecção direta pela RT-PCR, sobretudo quando o paciente busca tardiamente ajuda médica (BRASIL, 2019; CALVO et al., 2016; OHST et al., 2018).

Entre os métodos indiretos está a sorologia (ELISA), que é frequentemente usada para diagnóstico de rotina de infecções por DENV, sendo preferencialmente

aplicada após o intervalo de tempo para detecção direta do vírus (>4-5 dias após o início dos sintomas), ou após testes negativos por métodos diretos. Nas infecções primárias por DENV, os anticorpos IgM específicos são detectáveis em 50% dos pacientes no terceiro dia após o início dos sintomas, aumentando para 80-99% entre os dias cinco a dez. O pico de IgM é atingido após aproximadamente duas semanas de doença e tornam-se indetectáveis após 2-3 meses. A IgG anti-DENV começa a aumentar ao término da primeira semana da doença, permanecendo detectável por meses e anos. Nos casos de infecções secundárias, a resposta IgM é geralmente atrasada, baixa ou indetectável, enquanto os títulos de IgG aumentam (quatro vezes ou mais) rapidamente em dois dias após início dos sintomas, mostrando alta reatividade cruzada com outros flavivírus (GUZMÁN, KOURÍ, 2004; OHST et al., 2018).

O atraso ou a ausência de níveis detectáveis de IgM em algumas infecções secundárias podem levar a erros de diagnóstico; devido a isso, o teste combinado de IgM e IgG foi proposto como uma estratégia eficaz. Outra estratégia de detecção por ELISA é a ciência de que a produção dos anticorpos específicos para DENV da classe IgA acontece em paralelo aos da classe IgM em cerca de 70% dos casos, fazendo com que a determinação adicional de IgA possa garantir o diagnóstico de infecções recentes (ALCON et al., 2002; BRASIL, 2019; GUZMÁN; KOURÍ, 2004; LIBRATY et al., 2002; MATHEUS et al., 2016; OHST et al., 2018).

Além dessas estratégias, é possível realizar a detecção da proteína não estrutural NS1 do DENV por ELISA, no início dos sintomas em infecções primárias e secundárias, pois permanece detectável mesmo após a fase virêmica (até nove dias seguidos do início dos sintomas). Ainda é possível verificar que a NS1 parece não reagir de forma cruzada com soros de pacientes com infecção aguda por ZIKV, indicando alta especificidade. Foi visto também que altos níveis de NS1 se correlacionam com o desenvolvimento da febre hemorrágica da dengue, podendo servir de alerta para casos mais graves da doença. Outros métodos indiretos como o PRNT e inibição de hemaglutinação e imunoistoquímica podem auxiliar no diagnóstico correto da doença (ALCON et al., 2002; BRASIL, 2019; GUZMÁN; KOURÍ, 2004; LIBRATY et al., 2002; MATHEUS et al., 2016; OHST et al., 2018).

Além dos exames específicos, a observação das manifestações clínicas da doença também são fundamentais para realizar o diagnóstico. A dengue é uma doença febril aguda, sistêmica e dinâmica, apresentando um amplo espectro clínico

(quando sintomática); em geral, é debilitante e autolimitada, mas uma parte dos pacientes pode evoluir para formas graves, inclusive óbitos. Pode apresentar três fases clínicas: febril, crítica e de recuperação. Na fase febril, os principais sintomas são: febre (geralmente acima de 38°C), cefaleia, astenia, mialgia, artralgia, dor retro orbitária e diarreia (BRASIL, 2019).

Já na fase crítica, os sinais de alarme, quando presentes, são resultantes do aumento da permeabilidade capilar, que pode levar o paciente ao choque ou ao óbito por extravasamento de plasma e/ou hemorragias. Os principais sinais dessa fase são: dor abdominal intensa (referida ou identificada à palpação) e contínua, vômitos persistentes, acúmulo de líquidos, hipotensão postural e/ou lipotimia, letargia e/ou irritabilidade, hepatomegalia maior do que 2cm abaixo do rebordo costal direito, sangramento de mucosa e aumento do hematócrito (BRASIL, 2019).

A fase de recuperação é caracterizada pela melhora no estado geral do paciente, retorno progressivo do apetite, redução de sintomas gastrointestinais, estabilização do estado hemodinâmico e melhora do débito urinário. Além da sintomatologia, exames inespecíficos como hematócrito, contagem de plaquetas e a dosagem de albumina auxiliam na avaliação e monitoramento dos pacientes com suspeita ou diagnóstico confirmado de DENV, principalmente aqueles com sinais de alarme ou gravidade (BRASIL, 2019).

1.2.3 Aspectos clínicos e diagnóstico de Chikungunya

A infecção por CHIKV é diagnosticada laboratorialmente de forma semelhante às infecções por ZIKV e DENV, também fazendo uso de métodos diretos e indiretos. O uso de métodos diretos, como a detecção do RNA viral por RT-PCR e o cultivo viral são mais sensíveis quando aplicados durante os primeiros 5 dias de infecção (viremia). Passado esse período, os métodos indiretos são indicados, como a detecção de anticorpos (IgM e IgG) específicos contra o CHIKV, a partir do terceiro dia dos sintomas clínicos. Os testes indiretos mais utilizados são os mesmos já descritos anteriormente ELISA, IIFT, PRNT, inibição da hemaglutinação e imunohistoquímica. O diagnóstico diferencial deve incluir outras infecções cocirculantes capazes de causar sintomas semelhantes, levando em consideração a reatividade cruzada dentro do gênero *Alphavirus* (BRASIL, 2019; OHST et al., 2018).

O quadro clínico do paciente pode auxiliar no diagnóstico correto da doença que pode evoluir em três fases: febril ou aguda (duração de 5-14 dias), pós-aguda (curso de até 3 meses) e crônica (duração > 3 meses). Na fase aguda os principais sintomas são: febre alta, intensa poliartralgia (geralmente acompanhada de dorsalgia), exantema, cefaleia, mialgia, fadiga e conjuntivite não purulenta. A fase pós-aguda é caracterizada pela ausência de febre na maioria dos casos, juntamente com melhora da artralgia (embora haja a possibilidade de persistência ou agravamento desta), astenia, recorrência do prurido generalizado e exantema maculopapular, entre outros sintomas (BRASIL, 2019).

A persistência ou recorrência desses e/ou outros sinais e sintomas, principalmente dor articular, musculoesquelética e neuropática por um período superior a três meses, caracteriza a fase crônica. É possível ainda que a doença se manifeste de formas atípicas, como no caso de acometimento do sistema nervoso causando meningoencefalite, encefalopatia, convulsão, síndrome de Guillain-Barré, síndrome cerebelar, paresias, paralisias e neuropatias, evidenciando a importância de acompanhamento clínico e laboratorial para diagnóstico correto e prevenção de formas graves da doença (BRASIL, 2019; LUCENA-SILVA et al., 2017).

1.3 Patogenia das arboviroses e evolução para neuroarbovirose

Diversas manifestações neurológicas graves têm surgido no Brasil, após a infecção pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, intensificando-se nos períodos de surtos sazonais. Os processos de patogenia das arboviroses são bem conhecidos; por outro lado, os mecanismos patogênicos que levam ao comprometimento neurológico seguem amplamente desconhecidos, mas em processo de desenvolvimento teórico-experimental (ALMEIDA et al., 2021; MUSTAFÁ et al., 2019).

Nos subtópicos seguintes, os fundamentos teóricos sobre a imunopatogênese das neuroarboviroses são apresentados com base na revisão da literatura mais recente sobre o tema.

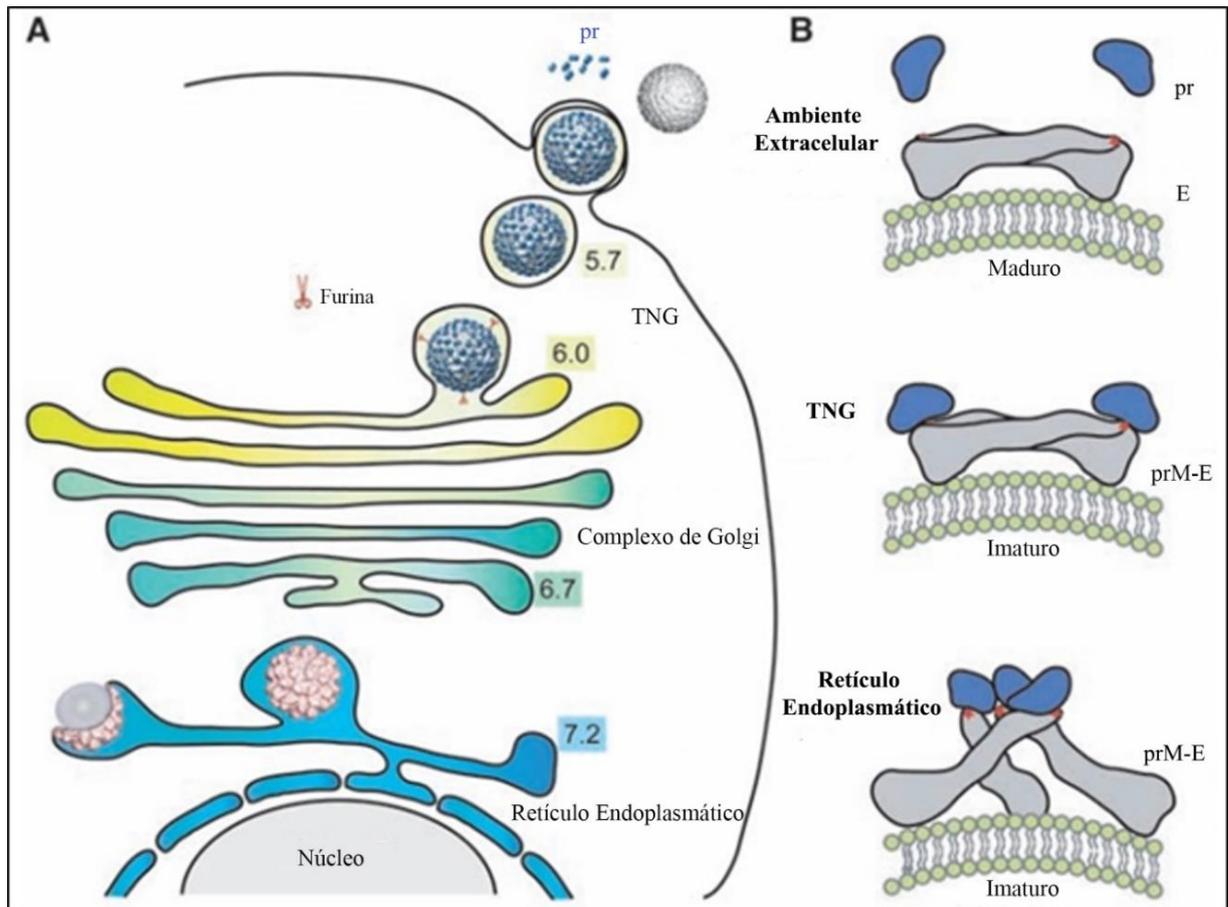
1.3.1 Patogênese ZIKV e DENV

Os flavivírus, incluindo ZIKV e DENV, são vírus que encapsulam um genoma de RNA de cadeia simples e senso positivo (+ssRNA), de aproximadamente 11kb, que codifica um único quadro de leitura aberto (ORF – do inglês: *open reading frame*). A poliproteína viral única é processada pelas proteases hospedeiras e virais em três proteínas estruturais (capsídeo (C), pré-membrana (prM) e envelope (E)) e sete proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) – todas estas responsáveis por mediar a replicação do genoma, o processamento da poliproteína viral e a modulação da resposta do hospedeiro (JAVED et al., 2017; LIN; HUANG; WU, 2017; PIERSON; DIAMOND, 2018; TIAN et al., 2018).

O alvo inicial da infecção por DENV são as células dendríticas imaturas (CDs) e as células de Langerhans residentes na pele. Um provável receptor de ZIKV é o complexo receptor de tirosina-quinase Gas6-AXL. A proteína Gas6 é encontrada predominantemente no cérebro, músculos e tecidos reprodutivos masculinos, enquanto a proteína AXL tirosina quinase está presente principalmente nos músculos e tecidos reprodutivos masculinos. Níveis baixos e médios de proteínas tirosina-quinase Gas6 e AXL também foram relatados nos tecidos reprodutivos femininos e na placenta (HASAN et al., 2018; TIAN et al., 2018).

Por compartilharem da mesma família e gênero, ZIKV e DENV apresentam um ciclo de replicação viral semelhante (Figura 1), a saber: os vírus adentram nas células através de endocitose mediada por receptores; o ambiente ácido do endossoma desencadeia a trimerização irreversível da proteína E, resultando na fusão das membranas virais e celulares; a partir disso, há a liberação do genoma viral (RNA) de senso positivo no citoplasma, dando origem a tradução da poliproteína; paralelamente, a replicação do genoma é iniciada por meio de um modelo de RNA negativo (-ssRNA) intermediário para a replicação genômica subsequente, que é seguida da montagem das partículas (HASAN et al., 2018; TIAN et al., 2018).

Figura 2 – Maturação dos Flavivírus



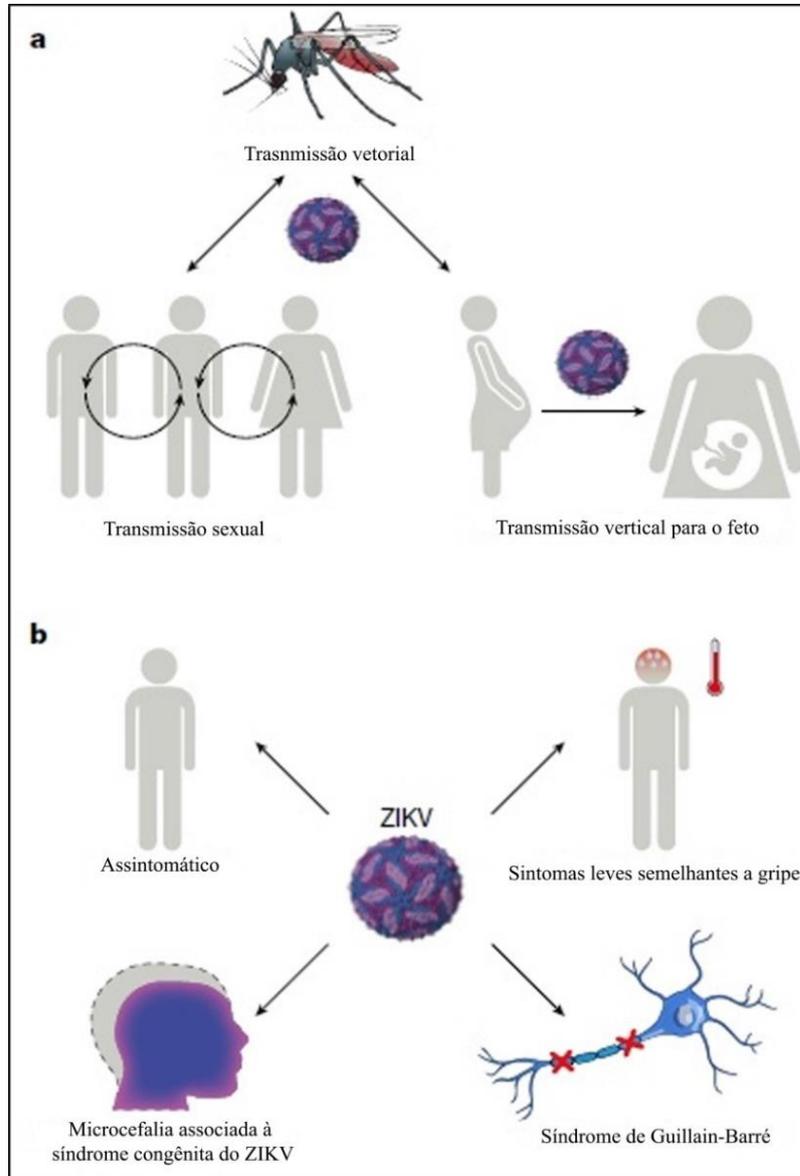
Fonte: Yu et al. (2008, tradução nossa).

Legenda: (A) As alterações conformacionais das partículas do vírus na via secretora. Partículas virais imaturas brotam no RE como viriões pontiagudos, sendo transportadas através do Golgi para o TGN, onde a acidificação provoca uma alteração conformacional do virion. A clivagem pela furina ocorre no TGN e o pr permanece associado até a liberação do vírion no meio extracelular. São indicados os valores aproximados de pH luminal do compartimento celular especificado. (B) Configuração das glicoproteínas na superfície do virião durante a maturação. A proteína E tem a estrutura preservada na via secretora, exceto pelos movimentos na articulação entre os domínios I e II. Em contrapartida, os estados de oligomerização das glicoproteínas são criticamente dependentes do pH. Os loops de fusão são evidenciados por estrelas vermelhas.

A síndrome clínica causada pelo ZIKV em humanos foi historicamente relatada como uma doença leve que desaparece em poucos dias, em casos de infecção sintomática. Contudo, durante as epidemias recentes, a infecção pelo ZIKV também tem sido associada, embora com pouca frequência, a doenças graves em adultos (incluindo falências de múltiplos órgãos, meningite, encefalite e trombocitopenia). Geralmente, o ZIKV não causa doença fatal em adultos, porém a mortalidade tem sido descrita em crianças com doença falciforme, em adultos com câncer e nos casos que desenvolvem a Síndrome de Guillain-Barré. Esta síndrome é uma polineuropatia progressiva ligada à infecção pelo ZIKV, que ocorreu em

1/6.500 a 1/17.000 indivíduos nas regiões endêmicas (Figura 3) (PIERSON, DIAMOND, 2018; STYCZYNSKI et al., 2017).

Figura 3 – Transmissão e manifestações clínicas do ZIKV



Fonte: Pierson, Diamond (2018, tradução nossa, adaptado)

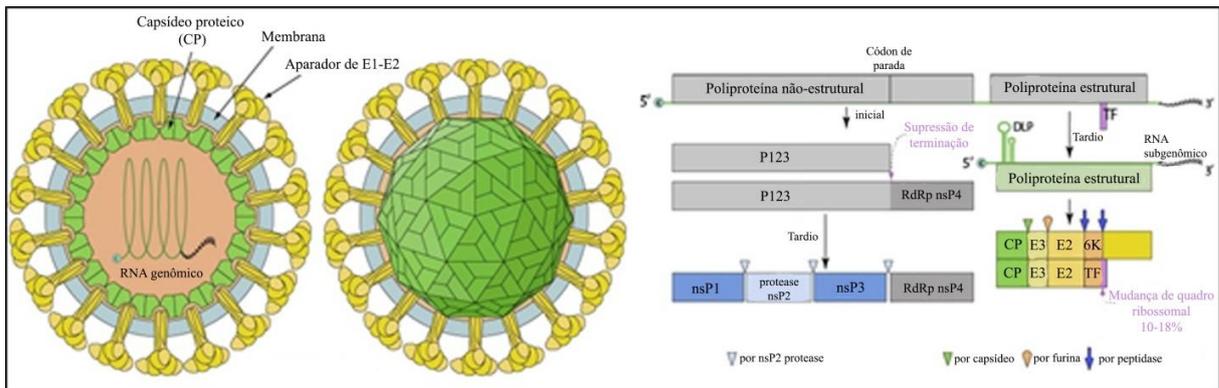
Legenda: (A) Transmissão. O vírus da ZIKA é transmitido em um ciclo epidêmico entre mosquitos do gênero *Aedes* e seres humanos. O ZIKV também pode ser transmitido verticalmente de uma mãe grávida infectada para seu feto. (B) Síndromes clínicas. Em casos de infecções sintomáticas, a maioria é caracterizada pelo desenvolvimento de sintomas leves, semelhantes a uma gripe leve, entretanto, alguns pacientes adultos têm a infecção ligada à síndrome de Guillain-Barré, que pode resultar em fraqueza muscular e paralisia; além disso, durante a gravidez, a infecção pelo ZIKV pode ocasionar o desenvolvimento de microcefalia, síndrome congênita do ZIKV e morte fetal.

Semelhante ao processo de infecção do ZIKV, o DENV é transmitido às populações humanas através de mosquitos vetores previamente infectados (gênero *Aedes*). Uma vez que o vetor transmite o vírus para indivíduo, o DENV infecta os

macrófagos na corrente sanguínea e, posteriormente, é levado até os gânglios linfáticos, onde se replica. Sabe-se também que as células endoteliais, e possivelmente as células da medula óssea, são suscetíveis a essa infecção. A transmissão da DENV leva a quadros clínicos que variam de processos patológicos assintomáticos a fatais, como no caso da Dengue grave, anteriormente denominada, febre hemorrágica e síndrome do choque da dengue. Além disso, em 2009, a OMS aprovou novas diretrizes considerando, pela primeira vez, as manifestações neurológicas na classificação de casos clínicos para dengue grave. Hoje já se sabe que o processo de reinfecção por um outro sorotipo do DENV pode causar a exacerbação do sistema imunológico, agravando os sintomas e levando às manifestações neurológicas graves (CAROD-ARTAL et al., 2013; CASTILLO-MÉNDEZ, VALVERDE-GARDUÑO, 2019; MEYDING-LAMADÉ, CRAEMER, SCHNITZLER, 2019).

1.3.2 Patogênese do CHIKV

O CHIKV é um alfavírus que pertence à família *Togaviridae*, esses vírus são esféricos e envelopados, com 60-70 nm de diâmetro. O genoma viral é composto por uma molécula de RNA fita simples de aproximadamente 12 kb, com polaridade positiva, apresentando na extremidade 5' um cap de 7-metilguanossina, enquanto a extremidade 3' contém uma cauda poliadenilada. O RNA viral é estruturado em duas ORFs, separadas por uma região intergênica (Figura 4). A primeira ORF na região 5' corresponde a dois terços do RNA genômico, podendo ser lido diretamente como um mRNA; este codifica as quatro proteínas não estruturais (nsP1-4), que são necessárias para transcrição e replicação do genoma viral. O terço localizado na região 3' dá origem às proteínas estruturais (C (capsídeo), E3, E2, 6K e E1); estas são codificadas por meio de um RNA de cadeia positiva subgenômico RNA 26S. Em resumo, a organização genômica pode ser descrita da seguinte forma: 5' m7G-nsP1-nsP2-nsP3-nsP4-(junção)-C-E3-E2-6K-E1-An 3'. As regiões 5', 3' e região intergênica abrigam elementos de sequências repetidas conservadas; esses elementos desempenham papéis importantes na regulação da síntese de RNA viral (CAGLIOTI et al., 2013; HERNANDEZ, BROWN, PAREDES, 2014; MOTA et al., 2015).

Figura 4 – Vírion e organização genômica dos vírus pertencentes à família Togaviridae (CHIKV)

Fonte: Swiss Institute of Bioinformatics (2017, tradução nossa, adaptado)

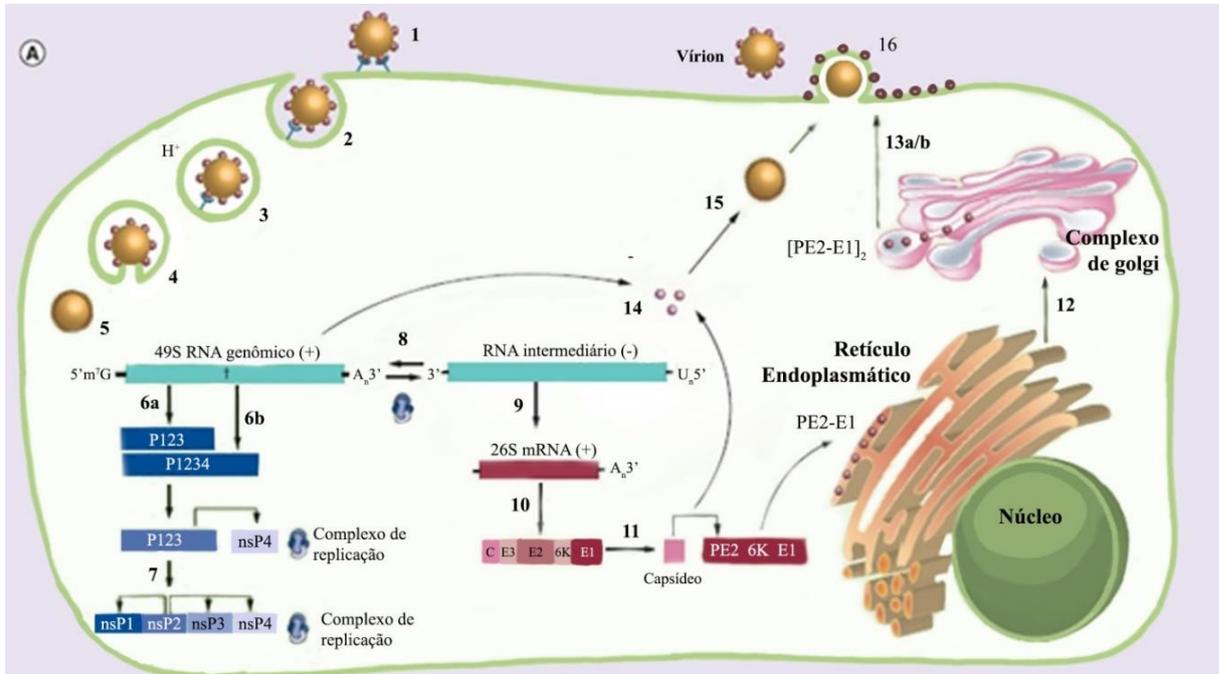
Legenda: Os alfavírus são organizados com as proteínas não estruturais na extremidade 5' do genoma, sendo traduzidas a partir do RNA genômico; já as proteínas estruturais são traduzidas a partir de um RNA subgenômico que inclui a extremidade 3' do genoma (HERNANDEZ, BROWN, PAREDES, 2014).

No processo infeccioso, os alfavírus adentram as células epiteliais e fibroblastos por endocitose, a acidez do endossomo provoca alterações conformacionais no envelope viral expondo o peptídeo E1, que, por sua vez, medeia a fusão da membrana celular vírus-hospedeiro (Figura 5). Ocorre então a liberação do genoma viral, cuja primeira ORF é traduzida em proteínas não estruturais nsP1-4. A nsP1 está envolvida na síntese da cadeia negativa do RNA viral e apresenta propriedades de capeamento de RNA. A nsP2 executa funções de RNA helicase, RNA trifosfatase e proteinase, além de estar envolvida no desligamento da transcrição de células hospedeiras. Já a nsP3 participa da unidade de replicase e a nsP4 atua como RNA polimerase viral (MOTA et al., 2015; SCHWARTZ, ALBERT, 2010).

Juntas, essas quatro proteínas formam um complexo de replicação viral e sintetizam um RNA intermediário de cadeia negativa, cuja função é ser modelo para a síntese de RNAs subgenômicos (26S) e genômicos (49S). O RNA subgenômico direciona a expressão da poliproteína C-pE2-6K-E1, que, posteriormente, é processada através da serina protease autoproteolítica. Após isso, há a liberação do capsídeo (C). Em seguida, as glicoproteínas pE2 e E1 surgem do processamento adicional, associam-se ao Golgi, sendo então exportadas para membrana plasmática, onde são clivadas, gerando E2 (envolvida na ligação ao receptor) e E3 (medeia o dobramento de pE2 e sua associação com E1). O vírus é montado pela ligação do nucleocapsídeo viral ao RNA viral, através do recrutamento das glicoproteínas do envelope que estão associadas à membrana. O alfavírus de

núcleo icosaédrico é liberado via brotamento na membrana celular (MOTA et al., 2015; SCHWARTZ, ALBERT, 2010).

Figura 5 – Ciclo replicativo dos alfavírus



Fonte: de Oliveira Mota et al (2015, tradução nossa, adaptado)

Legenda: 1-ligação ao receptor; 2-endocitose mediada por receptor; 3-acidificação do vacúolo; 4-fusão de membrana; 5-desmontagem do núcleo; 6a e b-tradução; 7-processamento; 8 e 9-transcrição; 10-tradução; 11-processamento; 12-processamento e maturação de glicoproteínas; 13-transporte de glicoproteínas processadas e ativação por furina; 14-empacotamento do RNA genômico; 15-montagem do nucleocapsídeo; 16-brotamento de partículas virais

A transmissão do CHIKV se dá por meio da picada de mosquitos do gênero *Aedes* infectados, podendo ainda ocorrer a transmissão vertical no período de viremia materna. Na maior parte dos casos, a sintomatologia clínica é caracterizada principalmente por febre alta, dor de cabeça, mialgia e artralgia irregular, recidivante e incapacitante; esses sintomas, ou parte deles, podem se tornar crônicos. Além disso, o vírus da chikungunya apresenta neurovirulência, podendo causar internações e mortes em unidades de terapia intensiva (BRASIL, 2019; CAGLIOTI et al., 2013; CERNY et al., 2017; SCHWARTZ, ALBERT, 2010).

1.3.3 Neuroarbovirose

As arboviroses são caracterizadas por um amplo espectro de síndromes clínicas, desde doenças febris leves a graves, até febre hemorrágica e ainda

doenças neuroinvasivas; estas podem levar a resultados fatais, ou deixar sequelas a longo prazo (Tabela 1). Nas regiões tropicais, o DENV tem sido associado ao comprometimento do sistema nervoso, sendo as apresentações neurológicas mais comuns: a meningite, encefalite, mielite, miosite, síndrome de Guillain-Barré, polirradiculoneurite, derrames e hemorragia cerebelar. Já o CHIKV, além de causar poliartralgia febril aguda e artrite prolongada, pode evoluir para quadros neurológicos graves como: paralisia flácida aguda, encefalite, neurite óptica, mielorradiculite e síndrome de Guillain-Barré. Ademais, o ZIKV tem sido associado, desde 2015, a um aumento no número de casos de microcefalia, síndrome de Guillain-Barré, encefalite, meningite, mielite transversa aguda e encefalomielite disseminada aguda (CERNY et al., 2017; MEYDING-LAMADÉ, CRAEMER, SCHNITZLER, 2019; VIEIRA et al., 2018).

Quadro 1 – Disposição das características das principais manifestações neurológicas das neuroarboviroses

Manifestações neurológicas (neuroarboviroses)	Características clínicas
Encefalopatia e encefalite	Encefalopatia é definida pelo <i>International Encephalitis Consortium</i> como "um estado clínico de estado mental alterado, manifestando-se como confusão, desorientação, alterações comportamentais ou outro comprometimento cognitivo". Em alguns pacientes esses sintomas podem se causados por encefalite, que é uma inflamação cerebral associada à infecção viral direta ou a uma manifestação inespecífica de uma doença sistêmica grave. Pacientes recuperados podem apresentar sequelas como epilepsia, demência pós-infecciosa e desordem cognitiva.
Mielopatia e mielite	Diz respeito ao acometimento da medula espinhal, causando fraqueza nos membros, alterações sensoriais, hiperreflexia, distúrbios intestinais e da bexiga, dependendo do nível de comprometimento. No caso de inflamação da medula espinhal confirmada por ressonância magnética, pleocitose no líquido cefalorraquidiano (LCR) ou título elevado de IgG no LCR, mostrando produção local de imunoglobulina, é classificada como mielite. A mielopatia e mielite geralmente ocorrem como consequência de uma doença neurológica mais disseminada.
Encefalomielite disseminada aguda	Ocorre após a infecção viral aguda que desencadeia uma síndrome inflamatória aguda que envolve o parênquima cerebral e a medula espinhal, acredita-se que isso se deve a uma resposta imunológica mediada à infecção, e não devido à invasão viral direta. A doença é caracterizada por ser monofásica e o diagnóstico é baseado em encontrar lesões desmielizantes na substância branca cerebral, focal ou multifocal, pouco demarcadas na ressonância magnética. Os principais sintomas são dor de cabeça, sonolência, envolvimento do nervo craniano (paralisia do nervo facial, vertigem, nistagmo e fraqueza bulbar), fraqueza nos membros, distúrbio sensorial e retenção urinária.
Síndrome de Guillain-Barré	Neuropatia periférica associada aos arbovírus sem doença do sistema nervoso central. Os pacientes apresentam fraqueza flácida bilateral simétrica, frequentemente com parestesia e/ou paralisia do nervo craniano. A complicação da neuroarbovirose demonstra ser decorrente de toda a gama de variantes da SBG, incluindo distúrbios dos axônios motores e sensoriais e bainhas de mielina, podendo ocorrer de forma conjunta. Entretanto mais estudos precisam ser realizados.
Complicações oculares	As neuroarboviroses podem levar a muitas complicações oculares que necessitam de tratamento emergencial. As principais complicações são: doenças da úvea, retina e nervo óptico. Além dos processos inflamatórios, existe a possibilidade de outras patologias como o deslocamento de retina, hemorragia intrarretiniana e oclusão de ramo da artéria retiniana.
Outras	Existem uma série de distúrbios estão sendo associados às neuroarboviroses, mesmo que em menor número, todos eles são relevantes. Entretanto ainda é difícil associar todos esses distúrbios às infecções por neuroarboviroses, o espectro completo dessas doenças parece ser amplo e carece de mais estudos.

Fonte: Baseado em Mehta et al. (2018)

Estes arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) podem acessar o sistema neurológico por algumas vias, a maioria delas envolvendo a barreira hematoencefálica (BHE). A BHE em homeostase é composta por células endoteliais fortemente aderidas por proteínas de junção apertada (TJP – do inglês: *tight junction protein*) em associação com células neurais. A barreira desempenha um papel fundamental na patogênese dos patógenos neurotrópicos, pois controla o acesso de moléculas de circulação, células imunes ou patógenos ao sistema nervoso central. Diante de uma infecção sistêmica, alguns arbovírus conseguem atravessar a BHE sem efeito citopático considerável. Foi relatada também a possibilidade desses arbovírus cruzarem a

barreira endotelial associada a leucócitos infectados. A inflamação sistêmica causada pela infecção induz a produção de mediadores inflamatórios que afetam a permeabilidade da BHE. Além disso, existe a possibilidade desses arbovírus se replicarem nas células endoteliais do cérebro e induzir a regulação negativa da expressão de TJP e/ou morte celular, promovendo a ruptura da barreira e a entrada dos vírus. Após entrada no parênquima cerebral os vírus infectam as células nervosas induzindo a liberação de mediadores inflamatórios (IL-6, VEGF, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10, MCP-1) e metaloproteinases, que promovem a regulação negativa de aderentes e TJPs, mantendo a permeabilidade da barreira aumentada. Há ainda a possibilidade de os vírus infectarem axônios, promovendo então o transporte axonal retrógrado que viabiliza a entrada no parênquima cerebral (MEYDING-LAMADÉ, CRAEMER, SCHNITZLER, 2019; MUSTAFÁ et al. 2019).

A grande problemática das neuroarboviroses é que ainda não se tem clareza a respeito dos possíveis mecanismos subjacentes que levam ao seu desenvolvimento. A febre e a mialgia são os únicos achados clínicos sugestivos para infecção arboviral associados ao diagnóstico laboratorial de DENV, ZIKV e CHIKV nos pacientes com manifestações neurológicas (até o momento não se tem conhecimento sobre a possibilidade de infecções assintomáticas causarem comprometimento neurológico) e em muitos dos casos os sinais neurológicos começam após um período livre de sintomas de 1-3 semanas, apontando para um processo autoimune. Além disso, existem outros vírus neurotrópicos com uma extensa sobreposição com as manifestações clínicas clássicas das arboviroses, e apesar da disponibilidade de ferramentas avançadas de diagnóstico microbiológico, o diagnóstico etiológico é alcançado em menos de 50% dos casos de supostas infecções virais do sistema nervoso central (SNC) (CAGLIOTI et al., 2013; CERNY et al., 2017; MEHTA et al., 2018; VIEIRA et al., 2018).

Um estudo realizado em Pernambuco evidenciou que, em pacientes com sintomas de neuroarboviroses, foi possível realizar a detecção de ZIKV através de RT-PCR tardiamente, após o início dos sintomas (mediana de 16,5 dias); e em alguns casos, a detecção direta do genoma viral se deu em até 48 dias após o início da doença. Uma hipótese para o isolamento tardio nesses casos é que pode haver um neurotropismo associado ao vírus mantendo a carga viral persistente no sistema nervoso central e nas meninges, o que justifica o início da inflamação e o dano do sistema nervoso, com fugas do vírus para o soro. Ademais, a coinfeção por

arbovírus tem sido detectada em pacientes com comprometimento neurológico e sabendo que os três arbovírus (ZIKV, DENV e CHIKV) são neuro virulentos não é possível saber se o comprometimento neurológico está sendo causado por um ou mais arbovírus. Seja o dano neurológico causado por mecanismo direto ou indireto (onde o efeito imunomediado é desconhecido) existem escassas evidências que defendam ambos os mecanismos. É reconhecido que o perfil inflamatório tem função importante na patogênese, sendo então de fundamental importância que estudos sejam realizados a fim de compreender se existem moléculas do universo inflamatório que possam ser utilizadas como potencial marcadores para casos graves de comprometimento neurológico (ALMEIDA et al., 2021; FERREIRA et al., 2017; MEHTA et al., 2018).

1.3.4 Mediadores solúveis da inflamação nas neuroarboviroses

O tipo de resposta imune celular é determinado pela expressão de mediadores solúveis e pela sua interação com receptores e moléculas imunológicas. Esses mediadores são citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. As citocinas são proteínas secretadas que atuam no crescimento, diferenciação e ativação celular; é através desses mecanismos que ocorrem a resposta imune efetora e sua regulação. A partir disso, no que diz respeito ao perfil inflamatório na patogênese, pesquisas observaram que pacientes infectados pelo ZIKV costumam apresentar uma resposta inflamatória com elevados títulos de mediadores (citocinas) pró-inflamatórios. Foi visto ainda que a resposta imunológica contra o ZIKV, na fase aguda, causa uma ativação polifuncional de células T (resposta Th1 (IL-2), Th2 (IL-4 e IL-13), Th9 (IL-9) e Th17 (IL-17)), caracterizando-se por um aumento nos níveis das respectivas citocinas, seguido por uma diminuição na fase convalescente (COLAVITA et al., 2018; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010; KAM et al., 2017; NAVECA et al., 2018; TAPPE et al. 2015).

Já as quimiocinas são pequenas citocinas com peso molecular variável de 7 a 15 kDa e que, junto com seus receptores, têm a principal função de mediar os processos de migração e residência das células que compõem o sistema imunológico, atuando tanto em processos inflamatórios quanto em homeostáticos. Para a classificação dessas quimiocinas, são considerados o número e o espaçamento dos aminoácidos existentes entre os dois primeiros resíduos de

cisteínas da extremidade N-terminal. Existem duas principais subfamílias: a CXC, em geral um quimiotático de neutrófilos; e a CC, majoritariamente quimiotáticos de monócitos e subtipos de linfócitos (GUERREIRO, SANTOS-COSTA, AZEVEDO-PEREIRA, 2011; PALOMINO, MARTI, 2015).

Quanto aos estudos sobre as quimiocinas, foi evidenciado a existência de um aumento nos níveis da CXCL10/IP-10 que está envolvida na apoptose dos neurônios fetais e na síndrome de Guillain-Barré; mostrando-se então um possível biomarcador promissor da infecção aguda por ZIKV na aplicação clínica. Somado a isso, também foi verificado a presença, em concentrações elevadas, de IP-10 em mulheres grávidas infectadas pelo ZIKV que carregavam fetos com malformações associadas ao crescimento fetal. Além disso, um outro estudo observou que, quando células mononucleares do sangue periférico (PBMC) saudáveis são infectadas por ZIKV, há a indução de IL-6, IL-8 e IL-9. Como efeito disso, averigua-se a ausência parcial ou completa de interferons do tipo I, II e III, os quais possuem papéis fundamentais na resposta imunológica eficaz indutora da eliminação viral (COLAVITA et al., 2018; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010; KAM et al., 2017; NAVECA et al., 2018; TAPPE et al. 2015).

Outros estudos sobre citocinas e quimiocinas comprovaram que, quando monócitos saudáveis foram infectados pelo CHIKV, houve a indução do aumento nos níveis solúveis de IFN- α , IP-10 e IL-1RA, na tentativa de ajudar e controlar a replicação viral. Uma pesquisa realizada na Índia, por exemplo, comparou o perfil de citocinas em pacientes com e sem comprometimento neurológico secundário à infecção pelo CHIKV. Nesse estudo indiano, foi verificado que quatro citocinas (TNF- α , IFN- α , IL-6 e monocina induzidas por IFN- γ) estavam em concentração significativamente maior nos pacientes que tiveram complicações neurológicas secundárias à infecção, em contraste com o grupo infectado sem sintomas neurológicos (KASHYAP et al., 2014; MEHTA et al., 2018).

As moléculas reguladoras do sistema imunológico, por sua vez, também interagem com as citocinas. Um exemplo dessa interação ocorre com as formas solúveis do antígeno leucocitário humano-G (HLA-G) (do inglês: *human leukocyte antigen G*), caracterizadas como moléculas de classe I não-clássicas do complexo principal de histocompatibilidade, e cujas propriedades são imunomoduladoras e tolerogênicas. Essas propriedades são exercidas por meio: (i) da inibição da atividade lítica das células NK (do inglês: *natural killers*) e linfócitos T citotóxicos; (ii)

da indução da apoptose das células T CD8+; (iii) da inibição da proliferação de células T CD4+; e (iv) da indução de células T reguladoras. Comprovando esses fatos, estudos *in vitro* com células neurais humanas SK-N-SH/RA (neuroblastoma) e U373MG (astrocitoma) mostraram aumento da molécula solúvel de HLA-G diante da infecção pelos vírus da raiva (RABV) e herpes simplex 1 (HSV-1); isso sugere um possível mecanismo de evasão da resposta imunológica (ALMEIDA et al., 2021; LAFON et., 2005; LUCENA-SILVA et al., 2012).

Todos esses estudos têm contribuído para o entendimento do processo imunopatológico de comprometimento neurológico posterior à infecção por arbovírus. No entanto, o papel desses mediadores solúveis na patogênese das manifestações neurológicas secundárias a arbovirose ainda não foi esclarecido, bem como a influência genética no desenvolvimento dessas formas graves entre indivíduos com mesmo grau de exposição ao agente infeccioso e diferente espectro da doença. É nesse ponto que se desenvolverá a seção seguinte da justificativa, pois existe a possibilidade de que o perfil inflamatório mediado durante a infecção pelos arbovírus possa apresentar assinatura que caracterize o padrão neuroinvasivo, sendo este um dos aspectos de relevância científica desta dissertação de mestrado.

2 JUSTIFICATIVA

Diferentes manifestações neurológicas graves têm sido descritas após a infecção pelos arbovírus. Isso se evidencia, particularmente, no Nordeste do Brasil, que se destacou após o surto de microcefalia, no ano de 2015, causado pela infecção por ZIKV; essas observações indicam o neurotropismo dos arbovírus (ZIKV, DENV, CHIKV). Nesse contexto, casos de polineuropatia aguda flácida, diagnosticadas como síndrome de Guillain-Barré, aumentaram cinco vezes na população exposta aos vírus. O estado de Pernambuco foi o que apresentou o maior número de casos de complicações neurológicas do país. Desde 2015 as sequelas permanentes secundárias a arboviroses têm sido identificadas em pacientes adultos que deixaram de ser economicamente produtivos (LUCENA-SILVA et al., 2018). Além disso, o grau de comprometimento cognitivo das crianças que apresentaram perímetro encefálico limítrofe durante a epidemia de ZIKV e CHIKV precisa ser esclarecido. Ademais, casos de manifestações neurológicas em adultos ainda continuam sendo diagnosticados após infecção pelos vírus DENV, ZIKV e CHIKV, mesmo na ausência da epidemia, ressaltando a importância do estudo da patogênese da neuroarbovirose.

Em um estudo anterior do nosso grupo de pesquisa, Almeida et al. (2021) descreveram que as complicações neurológicas secundárias a arbovirose foram associadas a um perfil predominantemente inflamatório; enquanto que, na ausência do comprometimento neurológico, o perfil era majoritariamente antiinflamatório. Todavia, com o objetivo de identificar um padrão de expressão de mediadores solúveis responsáveis pela diferença no perfil de resposta imune de indivíduos geneticamente não relacionados, mas com mesmo grau de exposição aos arbovírus, contribuindo para o desenvolvimento de complicações neurológicas, nós propomos um desenho experimental para análise da resposta imune de memória desses indivíduos. Neste, fizemos uso do sangue periférico de pacientes que tiveram neuro arbovirose e seu cônjuge a fim de, através do estímulo com antígenos de arbovírus *in vitro*, estudarmos a expressão diferencial dessas moléculas solúveis que são estimuladas pelos antígenos. As moléculas solúveis, como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, interagem entre si, modificando a resposta imunológica dos arbovírus e influenciando na permeabilidade da barreira hematoencefálica, contribuindo para o quadro neurológico das arboviroses. Essa análise adicionou

conhecimentos sobre essa rede de interação entre moléculas solúveis que propiciam o desenvolvimento do comprometimento neurológico pós-infecção por arbovírus, além de ter avaliado a qualidade da resposta imunológica de memória.

3 HIPÓTESE

Há diferença na resposta imunológica de memória em pacientes com histórico de neuroarbovirose e seu comunicante intradomiciliar, não geneticamente relacionado, frente ao desafio com antígenos dos arbovírus dengue, Zika e Chikungunya.

4 OBJETIVOS

A seguir, estão elencados os objetivos que guiaram a elaboração desta dissertação.

4.1 Objetivo Geral

Avaliar a resposta imunológica de memória em PBMC de pacientes com histórico de neuroarbovirose (Encefalite e Síndrome de Guillain-Barré) e seu comunicante intradomiciliar, não geneticamente relacionado, frente ao desafio com antígenos dos arbovírus: dengue, Zika e chikungunya

4.2 Objetivos Específicos

- a) Comparar os níveis de moléculas solúveis produzidas em PBMCs, de indivíduos com histórico de neuroarbovirose, induzidas pelo estímulo MOCK, e antígenos de DENV, ZIKV e CHIKV;
- b) Comparar o perfil de expressão de moléculas solúveis produzidas em PBMCs de indivíduos com histórico de encefalite e SGB secundária a arbovirose;
- c) Determinar diferenças no perfil de moléculas solúveis no sobrenadante de cultura de PBMCs de indivíduos com histórico de neuroarbovirose em relação aos seus comunicantes quando desafiados com antígenos de CHIKV e ZIKV;
- d) Caracterizar o perfil de resposta de memória dos pacientes com histórico de encefalite e SGB.

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Na sequência do texto, estão evidenciados, respectivamente, os aspectos éticos da condução deste trabalho, a descrição do tipo de estudo e as características metodológicas.

5.1 Considerações éticas

Este subprojeto é um desdobramento do trabalho intitulado “*Manifestações neurológicas associados a infecção por Zika vírus*” que foi aprovado pelo CEP da FIOCRUZ-PE, sobre o registro CAAE:51106115.8.0000.5190, seguindo a recomendação da legislação brasileira de pesquisa com seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

5.2 Tipo, local de estudo e coleta de amostra

O estudo é experimental observacional, cujos casos estudados foram selecionados dentre os pacientes com mais de 18 anos diagnosticados clinicamente e em laboratório com infecção por arbovírus manifestados neurologicamente. Esses pacientes foram atendidos pelos profissionais do Setor de Neurologia do Hospital da Restauração (HR), em Recife; e, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram devidamente cadastrados no projeto. Também foram selecionados, para cada paciente com caso neurológico após a infecção por arbovirose, um comunicante que manteve contato próximo. De preferência, esses comunicantes deveriam ser intradomiciliares, não relacionados geneticamente, sem história de arboviroses; ou, alternativamente, com história de arboviroses, mas sem manifestação neurológica.

Para estudo do perfil inflamatório, juntamente com o HLA-G, foram comparados os níveis de 36 mediadores solúveis expressos no sobrenadante das diferentes culturas de PBMCs de pacientes acometidos neurologicamente, em paralelo a seus comunicantes intradomiciliares. O número amostral foi reduzido, composto por 16 pacientes e seus respectivos comunicantes, devido ao custo do ensaio e à grande geração de dados. Assim sendo, foram priorizadas as análises dos pares não relacionados geneticamente, exposto, sem infecção viral.

Os mediadores solúveis da inflamação foram expressos pelas PBMCs mediante o desafio com antígenos inativos dos arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV), produzidos no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE - Fiocruz Pernambuco). Após oito dias de cultivo em células VeroE6, os sobrenadantes das culturas foram coletados e centrifugados para retirar os debris; posteriormente, o material infeccioso teve sua atividade viral testada em cultivo de células por meio de um MAC-ELISA. A inativação do vírus foi realizada adicionando Betapropiolactona (BPL) a 0,025% por 24 horas à 4°C com agitação intermitente. Uma vez confirmada a inativação do vírus, o material inativado foi purificado e concentrado em colunas Amicon Ultra-15 centrifugal filter de 100 kDa (Merck), distribuído em alíquotas de 0,5 ml e estocado a -80°C. Posteriormente foi titulado, por ELISA, e utilizado como antígeno em ensaios sorológicos. O antígeno normal (MOCK), sobrenadante de cultivo de VeroE6 na ausência do vírus, foi utilizado como controle e o preparo se deu como supracitado.

5.3 Cultura de células PBMCs para estímulo

Para o isolamento das PBMCs, foram coletados três tubos com sangue (15 mL) de cada paciente, tendo a heparina como anticoagulante. Em dois tubos cônicos de 15 mL, as células sanguíneas foram fracionadas por gradiente de densidade, mediante a adição de cerca de 7 mL de sangue sobre 4 mL de Ficoll-Paque. Os tubos cônicos foram então submetidos a centrifugação a 2000 RPM, por 30 minutos, com uma aceleração de 7 e frenagem de 5. Após a centrifugação, foi feita a remoção do plasma sanguíneo seguida da sua inclusão em tubos criogênicos, sem que houvesse mistura entre os materiais dos dois tubos. Na sequência, foram armazenados a fim de servirem de amostras para estudos futuros. O anel de leucócitos formado ao final da centrifugação foi transferido para outro tubo cônico de 15 mL e o volume foi preenchido com meio RPMI incompleto, com o objetivo de lavar as células para evitar um maior estresse celular no meio de cultura. Esse tubo de lavagem foi submetido à centrifugação a 1600 RPM, por 6 minutos, com aceleração de 9 e frenagem de 7. Feito isso, o sobrenadante foi desprezado e 2 mL de meio RPMI completo (20% de soro bovino fetal) foram adicionados para ressuspender o *pellet* formado. Na intenção de determinar o número de células por mL de suspensão, a contagem das células foi realizada e, para isso, foram

adicionados 95µL de Trypan Blue e 5 µL de amostra. Com isso, a homogeneização foi realizada e, em seguida, 10 µL da mistura foram pipetados e adicionados na Câmara de Neubauer para visualização em microscópio óptico; nessa etapa, uma contagem igual ou próxima ao valor de 12×10^6 em 2.400 µL (200 µL para cada poço da placa = 1×10^6 células) foi a considerada ideal para cultivo.

As células foram estimuladas com os antígenos Mock, DENV, CHIKV e ZIKV na diluição de 1:20 e, em cada poço da placa, foram adicionados 200 µL alcançando então a concentração final de 1:40; isso se deu devido aos 200 µL de suspensão de células. Cada estímulo foi realizado em duplicata para as PBMCs de cada indivíduo, inclusive o controle negativo, que era composto pela suspensão de células e adição de 200 µL de meio RPMI completo. No estímulo PHA (fitohemaglutinina, do inglês: *phytohaemagglutinin*), a concentração diferiu, pois adquiriu-se comercialmente esse antígeno na concentração de 1.510 µg/mL; preparou-se então uma solução na concentração de 2,5 µg/mL e distribuiu-se 200 µL em cada poço, alcançando a concentração de 1,25 µg/mL. Na montagem da placa, primeiro foram adicionados os estímulos e, em seguida, a suspensão das células; a placa montada (Tabela 2) foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C, por 36 horas (+/- 6 horas). Finalizado o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C, para avaliação posterior dos mediadores solúveis.

Quadro 2 – Desenho do experimento de cultura de células para estímulo

PACIENTE			
<u>Negativo</u> 200 µL de RPMI completo 200 µL de células	<u>Negativo</u> 200 µL de RPMI completo 200 µL de células	<u>Antígeno Dengue</u> 200 µL de antígeno Dengue 200 µL de células	<u>Antígeno Dengue</u> 200 µL de antígeno Dengue 200 µL de células
<u>Antígeno MOCK</u> 200 µL de antígeno Vero 200 µL de células	<u>Antígeno MOCK</u> 200 µL de antígeno Vero 200 µL de células	<u>Antíg. Chikungunya</u> 200 µL de Ag Chikungunya 200 µL de células	<u>Antíg. Chikungunya</u> 200 µL de antígeno Chikungunya 200 µL de células
<u>Antígeno PHA</u> 200 µL de Ag PHA 200 µL de células	<u>Antígeno PHA</u> 200 µL de Ag PHA 200 µL de células	<u>Antígeno Zika</u> 200 µL de Ag Zika 200 µL de células	<u>Antígeno Zika</u> 200 µL de Ag Zika 200 µL de células
COMUNICANTE			
<u>Negativo</u> 200 µL de RPMI completo 200 µL de células	<u>Negativo</u> 200 µL de RPMI completo 200 µL de células	<u>Antígeno Dengue</u> 200 µL de antígeno Dengue 200 µL de células	<u>Antígeno Dengue</u> 200 µL de antígeno Dengue 200 µL de células
<u>Antígeno MOCK</u> 200 µL de antígeno Vero 200 µL de células	<u>Antígeno MOCK</u> 200 µL de antígeno Vero 200 µL de células	<u>Ag Chikungunya</u> 200 µL de antígeno Chikungunya 200 µL de células	<u>Antíg. Chikungunya</u> 200 µL de antígeno Chikungunya 200 µL de células
<u>Antígeno PHA</u> 200 µL de antígeno PHA 200 µL de células	<u>Antígeno PHA</u> 200 µL de antígeno PHA 200 µL de células	<u>Antígeno Zika</u> 200 µL de antígeno Zika 200 µL de células	<u>Antígeno Zika</u> 200 µL de antígeno Zika 200 µL de células

Fonte: Fiocruz Pernambuco (2019).

5.4 Níveis de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Para a determinação quantitativa dos níveis de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi utilizado o kit Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos da América). Antes de iniciar os procedimentos, os reagentes foram mantidos em temperatura ambiente; além disso, realizou-se um desenho de placa, indicando a localização dos padrões, amostras e controles. Alguns reagentes do kit foram diluídos de acordo com a recomendação do fabricante, a saber:

- a) diluiu-se 50 mL da *Wash Solution* (em português: solução de lavagem) de 20x para 1x após a adição em 950 mL de água deionizada e homogeneizada;
- b) em três tubos, os três *Standards* (em português: padrões) liofilizados foram reconstituídos com 50% do *Assay Diluent* (em português: diluente de ensaio) e com 50% do meio de cultivo celular do experimento anterior (o volume adequado para diluição estava sinalizado no tubo fornecido pelo kit);
- c) incubou-se os padrões reconstituídos por 10 min;
- d) terminada a incubação, os padrões foram homogeneizados (sem utilizar vórtex para não formar espuma) a fim de garantir a completa reconstituição
- e) ao fim, os padrões foram incubados por mais 5 min.

O conteúdo dos três tubos combinados equivale ao volume de 1 mL.

Para o preparo da curva padrão, foram utilizados 8 tubos. No primeiro, adicionou-se 100 µL de cada um dos três padrões reconstituídos, totalizando 300 µL de Padrão 1 (1:3). Nos outros 7 tubos, foram acrescentados 150 µL da mistura diluente (50% do *Assay Diluente* e 50% do meio de cultivo celular do experimento anterior). Feito isso, 75 µL foram retirados do primeiro tubo e adicionados no segundo tubo, gerando o Padrão 2 (1:9). A curva de diluição sucedeu-se dessa maneira até o tubo de número 7 (Padrão 7, 1:2107). O oitavo tubo funcionou como branco, logo, nada foi adicionado a essa mistura diluente. Finalizado esse processo, concluiu-se a curva padrão. As amostras utilizadas no experimento que excederam a curva padrão foram diluídas com o meio de cultura utilizado no cultivo.

Na etapa seguinte, foi possível dar início ao procedimento de captura do analito. As *beads* (1X *Antibody Beads*) foram agitadas no vórtex por 30 segundos e, posteriormente, sonicadas por mais 30 segundos imediatamente antes do uso; em seguida, 12,5 µL das *beads* foram adicionados em cada poço e a placa foi então protegida da luz. Realizou-se a lavagem duas vezes com a adição de 100 µL da solução de lavagem; antes do descarte do sobrenadante, a placa de ensaio foi posta em cima da placa magnética por um período de 30-60 segundos, com a intenção de acomodar as *beads* no fundo dos poços; após isso, o descarte foi realizado. Na sequência, adicionou-se: (I) 12,5 µL do *Incubation Buffer* (em português: tampão de incubação) em cada poço; (II) 25 µL da mistura diluente com padrões nos poços destinados aos padrões; (III) 25 µL do branco nos poços correspondentes ao branco; (IV) 12,5 µL do meio de cultivo utilizado; e (V) 12,5 µL das amostras nos poços

destinados às amostras. Ao final desse procedimento, a placa foi coberta e incubada *overnight*, entre 2-8°C, sob agitação.

No dia seguinte, o anticorpo de detecção (*1X Biotinylated Detector Antibody*) foi preparado seguindo a proporção de 50 µL de *Biotin Diluent* (em português: diluente de biotina) e 5 µL de *10X Biotinylated Antibody* (em português: anticorpo biotilado (10x)); esse volume de 55 µL é correspondente a dois poços. O volume total foi preparado de acordo com a quantidade de amostras a serem analisadas, mas, antes, os poços foram novamente lavados por duas vezes, com 100 µL da solução de lavagem, seguindo o protocolo de lavagem anteriormente citado.

Na sucessão, adicionou-se 25 µL do anticorpo de detecção; feito isso, a placa foi coberta e incubada à temperatura ambiente, por 1h, sob agitação. Após a incubação, a placa foi lavada mais duas vezes com 100 µL da solução de lavagem, seguindo o protocolo, e, posteriormente, foram adicionados 25 µL da solução *1X Streptavidin-RPE* (proporção de 5 µL de *10X Streptavidin-RPE* (fotossensível) em 50 µL do diluente RPE) em cada poço; a placa foi então coberta e incubada à temperatura ambiente, por 30 min, sob agitação. Passado o período de incubação, o líquido foi decantado e realizou-se lavagens por três vezes, conforme protocolo, com a adição de 100 µL da solução de lavagem.

Por fim, antes da realização da leitura, adicionou-se 75 µL da solução de lavagem e deixou-se a placa sob agitação por um período de 3 min. Os dados foram obtidos utilizando o MAGPIX® *Multiplexing Instrument* (Luminex Corporation, Austin, Estados Unidos da América). Os mediadores solúveis e suas respectivas sensibilidades analíticas, de acordo com o fabricante, foram: EGF (< 5 pg/mL), Eotaxin (< 0.5 pg/mL), FGF- basic (< 5 pg/mL), G-CSF (< 15 pg/mL), GM-CSF (< 0.5 pg/mL), HGF (< 5 pg/mL), IFN-α (< 5 pg/mL), IFN-γ (< 0.5 pg/mL), IL-1α (< 0.5 pg/mL), IL-1β (< 0.05 pg/mL), IL-1RA (< 0.5 pg/mL), IL- 2 (< 0.5 pg/mL), IL-2R (< 25 pg/mL), IL-3 (< 5 pg/mL), IL-4 (< 1 pg/mL), IL-5 (< 0.5 pg/mL), IL-6 (< 0.5 pg/mL), IL- 7 (< 5 pg/mL), IL-8 (< 0.5 pg/mL), IL-9 (< 0.5 pg/mL), IL-10 (< 0.5 pg/mL), IL-12 (< 1 pg/mL), IL-13 (< 5 pg/mL), IL-15 (< 10 pg/mL), IL-17A (< 1 pg/mL), IL-17F (< 10 pg/mL), IL- 22 (< 10 pg/mL), IP-10 (< 0.5 pg/mL), MCP-1 (< 5 pg/mL), MIG (< 5 pg/mL), MIP-1α (< 5 pg/mL), MIP-1β (< 5 pg/mL), RANTES (< 5 pg/mL), TNF-α (< 0.5 pg/mL), e VEGF (< 0.05 pg/mL).

5.5 Níveis de HLA-G solúvel (HLA-Gs)

Os níveis de HLA-Gs (isoformas HLA-G1 e HLA-G5) foram mensurados, no sobrenadante da cultura de células dos pacientes e de seus comunicantes, por meio de ELISA do tipo sanduíche. Inicialmente, as placas de microtitulação de alta ligação (CORNING, Corning, Estados Unidos da América) foram sensibilizadas com 100 µL do anticorpo de detecção, MEM-G/9: *Mouse-a-human* HLA-G mAb [10 µg/mL] (EXBIO, Vestec, República Tcheca), diluído (1:100) em tampão fosfato – pH 7,2 (PBS 1x); e incubadas por 18 horas à 4°C.

Posteriormente, realizou-se quatro lavagens com 300 µL de PBS Tween 20 a 0,1% – pH 7,2 (SIGMA, Saint Louis, Estados Unidos da América); em seguida, o bloqueio foi realizado com 300 µL de DILUENT DAKO (DAKO, Brooklyn, Estados Unidos da América) e deixado em incubação, com agitação leve de 90-120 minutos, em temperatura ambiente. Finalizado esse período, procedeu-se com mais quatro lavagens com 300 µL de PBS Tween 10 a 0,1% – pH 7,2, realizando-se, na sequência, uma nova incubação com agitação leve. Feito isso, realizou uma incubação após a adição de 50 µL de sobrenadante da cultura de células e/ou com o padrão, por um período de 45-60 minutos, em temperatura ambiente. Em cada poço foram adicionados 50 µL de DILUENT DAKO para completar o volume final de 100 µL. O padrão foi diluído em uma curva de 5 pontos com concentrações de 200, 100, 50, 25 e 12,5 ng/mL (esse padrão foi feito com a proteína HLA-G5 obtida do sobrenadante da cultura de células do hibridoma MEM9G5).

Passado o período de incubação, lavou-se a placa mais quatro vezes com 300 µL de PBS Tween 10 a 0,1% – pH 7,2; na sucessão, adicionou-se 100 µL do anticorpo de revelação Rabbit-anti-human β2microglobulin (DAKO, Brooklyn, Estados Unidos da América) diluído (1:10.000) em PBS 1x; mais um processo de incubação foi realizado por um período de 45-60 minutos, em temperatura ambiente. Em seguida, outro processo de lavagem com 300 µL de PBS Tween 10 a 0,1% – pH 7,2 foi realizado por quatro vezes, uma nova incubação foi realizada com o 100 µL do enhancer DAKO ENVISION System HRP rabbit (DAKO, Brooklyn, Estados Unidos da América) diluído (1:200) por um período de 45-60 minutos, sob agitação leve e em temperatura ambiente. Procedeu-se com mais um processo de lavagem, conforme supracitado, e uma nova incubação foi realizada, dessa vez na ausência de luz e utilizando 150 µL de tetrametilbenzidina super sensitive (TMB5) (SIGMA,

Saint Louis, Estados Unidos da América) por um período de 20 minutos. A reação foi finalmente revelada por meio da adição de 100 μ L de HCl 1N.

As densidades ópticas, por fim, foram medidas a 450 nm utilizando o software MultiScan FC. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os níveis de sHLA-G total foi determinado por meio da curva padrão com cinco pontos, utilizando diluições de HLA-G5 calibrado como reagente. Os resultados foram expressos em ng/mL.

5.6 Análise Estatística

Os níveis dos mediadores solúveis, incluindo o HLA-G, foram analisados através da média e mediana com o software SPSS (versão 20 (SAS Institute, Cary, NC)) e GraphPad Prism (versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.)), sendo o *P*-valor $\leq 0,05$, considerado significativo. Os dados clínicos foram avaliados por meio de análise descritiva. Para averiguar se os dados obtidos seguiam a distribuição Gaussiana, foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Nas análises de amostras relacionadas, utilizou-se Wilcoxon; para as análises paramétricas utilizou-se Levene mais teste *t*; enquanto que, para as análises não-paramétricas, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram empregados. As correlações entre os 36 mediadores solúveis foram avaliadas por meio do Coeficiente de Correlação de Spearman, e apenas $Rho > 0.9$ e $P < 0,01$ foram considerados.

6 RESULTADOS

Na sequência do texto, após executada as metodologias descritas anteriormente, estão detalhados os resultados obtidos.

6.1 Perfil da população de estudo

O estudo foi composto por 16 pacientes atendidos no Setor de Neurologia do HR, em Recife, entre 2015 e 2016, com diagnóstico clínico e laboratorial de infecção por arbovírus, seguida por complicações neurológicas. Seis pacientes foram confirmados como portadores de encefalite e dez como portadores de síndrome de Guillain-Barré secundária à arbovirose. A imunidade de memória desses pacientes foi avaliada comparando os níveis de vários mediadores solúveis liberados no sobrenadante de cultura de PBMCs estimulados com MOCK, PHA, CHIKV, DENV e ZIKV. Em conjunto, alguns mediadores solúveis, IL-10 ($P = 0,023$), IL-12 ($P = 0,015$), VEGFA ($P = 0,009$) e IFN- α ($P = 0,035$) apresentaram-se aumentados na presença dos estímulos com DENV, CHIKV e ZIKV em relação à cultura sem estímulo. Além desses, os mediadores MIG ($P = 0,053$) e IL-1 α ($P = 0,078$) também apresentaram níveis elevados, porém sem atingir a significância estatística.

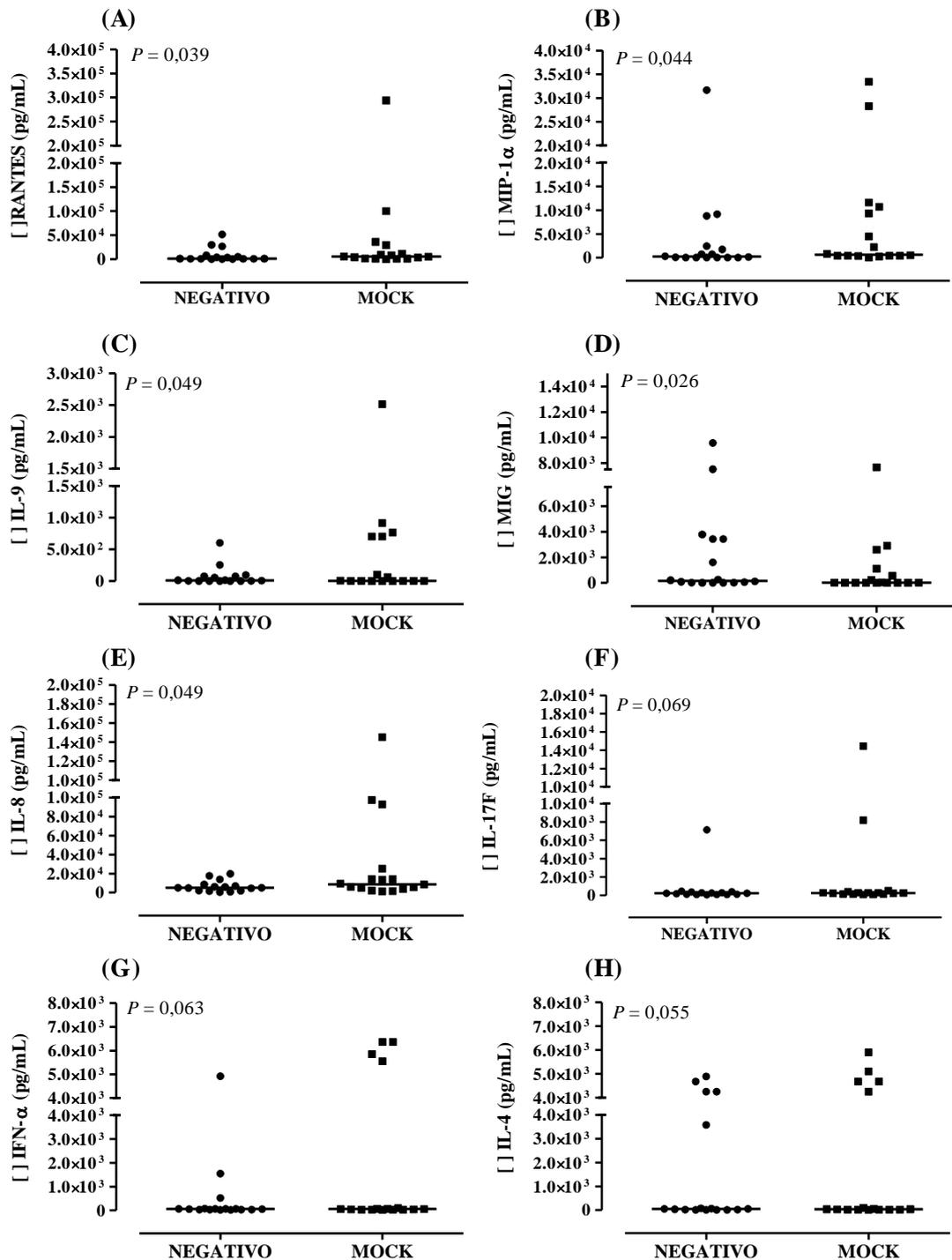
Esses resultados são observacionais e apenas demonstram o aumento significativo desses mediadores, mas sem relação com a apresentação clínica da doença.

6.2 Influência do antígeno normal (MOCK) sobre o perfil de expressão dos mediadores

Considerando que antígenos virais utilizados no estudo de desafio (DENV, ZIKV e CHIKV) foram obtidos no sobrenadante da cultura dos respectivos vírus em células VeroE6 (linhagem celular derivada do rim do macaco verde africano), após a inativação viral, purificação e concentração biofísica, nós utilizamos como controle negativo o sobrenadante das células VeroE6 não infectadas (MOCK) submetidas aos mesmos processos da cultura infectada para avaliar a existência de uma resposta imunológica inespecífica aos antígenos de células VeroE6. Para tanto, comparou-se a expressão dos mediadores solúveis produzidos pela cultura de

PBMC sem estímulo (NEG) ($n = 16$) com os resultados obtidos a partir da cultura na presença do MOCK ($n = 16$). Diferenças significativas foram observadas nos níveis de RANTES ($P = 0,039$), MIP-1 α ($P = 0,044$), IL-9 ($P = 0,049$), MIG ($P = 0,026$) e IL-8 ($P = 0,049$) (Figura 6A-D).

Além desses resultados, houve tendência estatística à significância em relação a IL-17F ($P = 0,069$), IFN- α ($P = 0,063$) e IL-4 ($P = 0,055$) (Figura 6E-H). Como os PBMCs responderam de forma inespecífica ao antígeno MOCK, todas as subsequentes análises de expressão dos mediadores aos estímulos virais foram comparadas com a expressão induzida pelos antígenos MOCK, e não mais com a cultura sem estímulo (NEG).

Figura 6 – Resposta imunológica inespecífica de PBMC aos antígenos MOCK

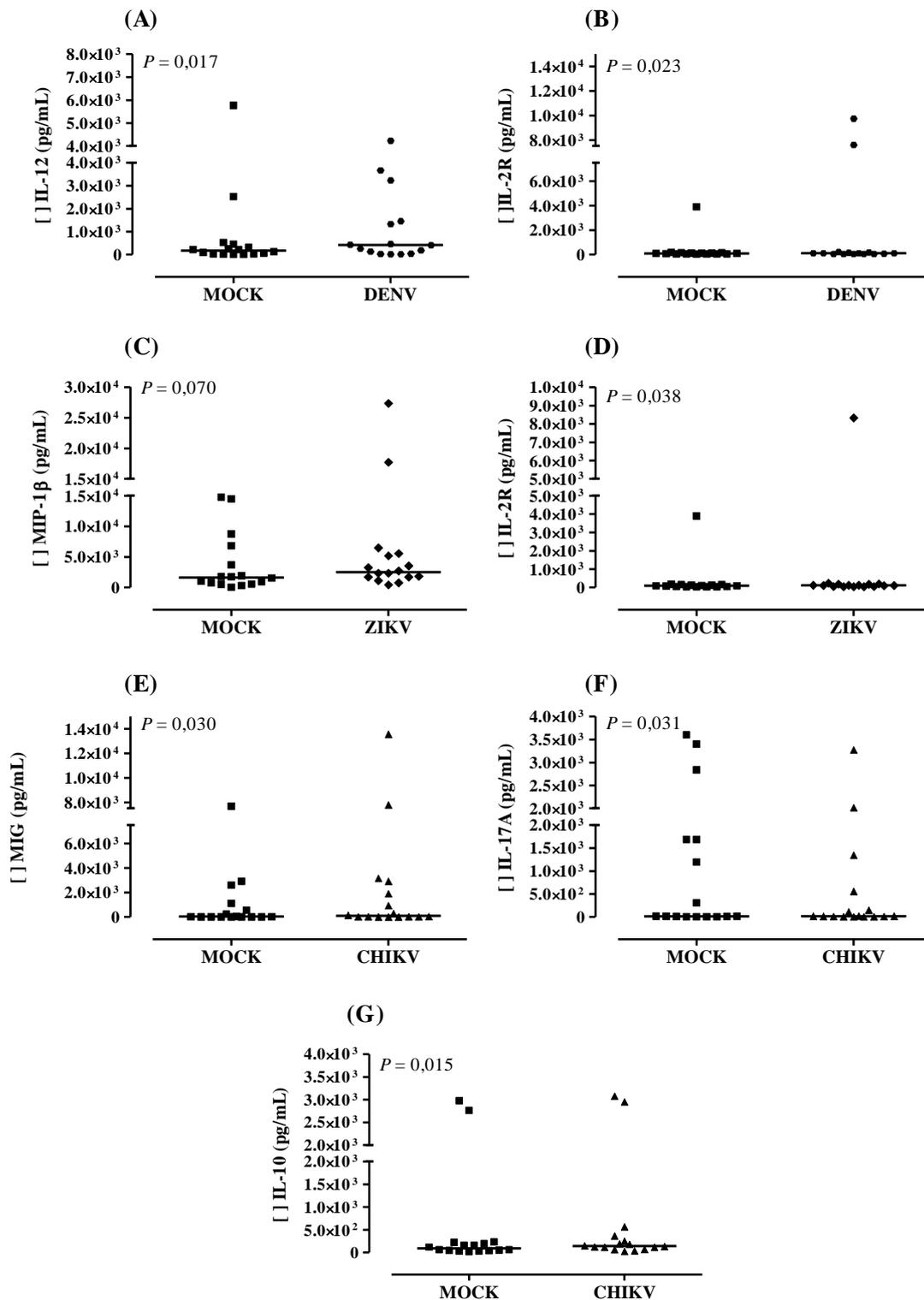
Fonte: O autor.

Legenda: (A-E) Mediadores solúveis com diferença estatística significativa (aumentados) em relação ao estímulo de MOCK. (F-H) Mediadores solúveis que demonstraram tendência à diferença estatística. NEGATIVO (n = 16) e MOCK (n = 16). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Wilcoxon.

6.3 Resposta imunológica de memória de pacientes com histórico de neuroarbovirose a antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV)

O perfil da resposta imunológica de memória foi avaliado considerando os estímulos virais individualmente (DENV, ZIKV e CHIKV) ($n = 16$), em relação ao estímulo MOCK ($n = 16$). Como resultado, verificou-se que os diferentes estímulos virais mostraram diferenças na expressão dos mediadores solúveis, conforme descrito: a resposta de memória aos antígenos DENV foi caracterizada pelo aumento de IL-12 ($P = 0,017$) e IL-2R ($P = 0,023$) (Figura 7A-B); a resposta mediada pelo ZIKV foi caracterizada pelo aumento de IL-2R ($P = 0,038$) e MIP-1 β ($P = 0,070$), com este último não atingindo a significância estatística (Figura 7C-D); e a resposta de memória aos antígenos de CHIKV foi caracterizada pelo aumento de IL-10 ($P = 0,015$), IL-17A ($P = 0,031$) e MIG ($P = 0,030$) (Figura 7E-G).

Figura 7 – Resposta imunológica de memória em cultura de células mononucleares de pacientes com histórico de neuroarbovirose desafiadas com antígenos dos arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV)



Fonte: O autor.

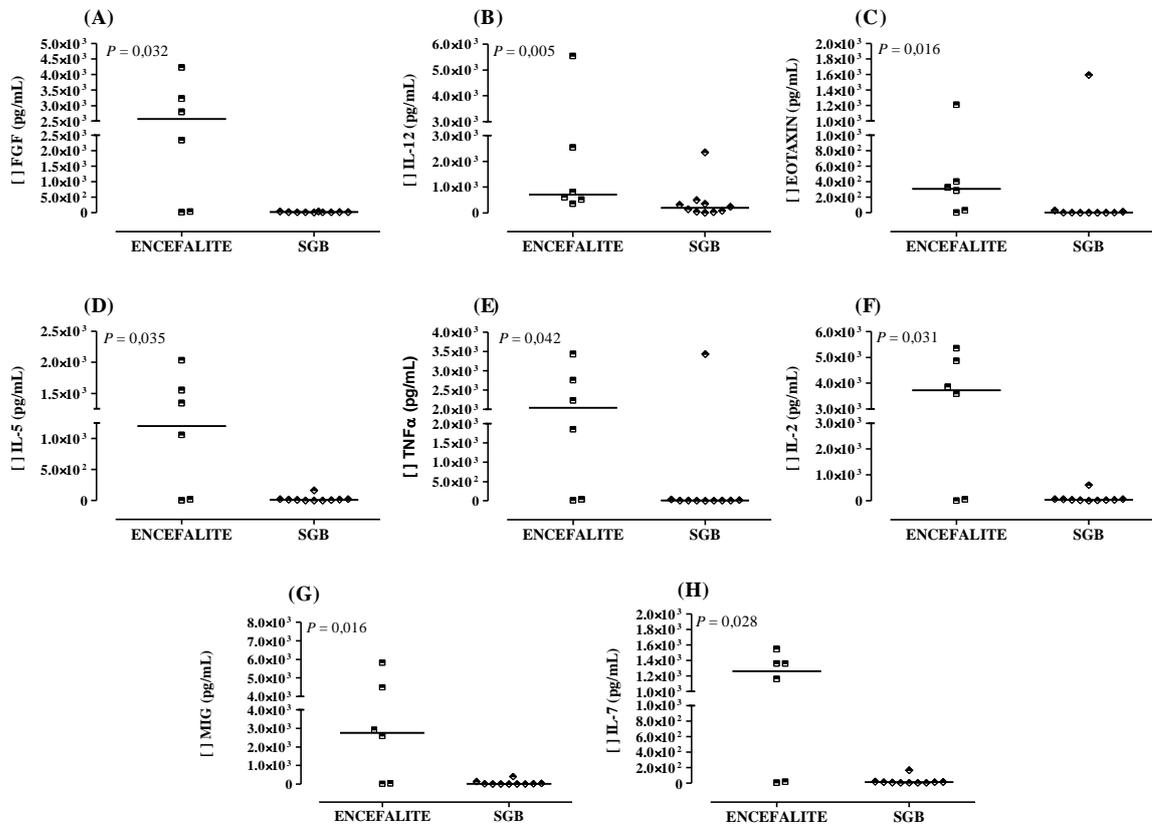
Legenda: (A-B) Mediadores solúveis diferencialmente expressos (aumentados) em relação à DENV. (C-D) Mediadores solúveis diferencialmente expressos e com tendência estatística, em relação à em relação à ZIKV. (E-G) Mediadores solúveis diferencialmente expressos em relação à CHIKV. MOCK, DENV, CHIKV e ZIKV (n = 16, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Wilcoxon.

6.4 Perfil imunológico de memória de pacientes de acordo com a síndrome neurológica secundária à arbovirose

A diferença da resposta de memória de pacientes com histórico de acometimento do sistema nervoso central (encefalite, $n = 6$) e do periférico (Síndrome Guillain-Barré, $n=10$), secundários à arbovirose, foi analisada comparando-se os níveis de mediadores em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes, frente ao desafio com antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV).

Na presença de antígenos DENV, as células dos pacientes com histórico de encefalite apresentaram um aumento dos níveis de IL-15 ($P = 0,075$) e IL-2 ($P = 0,078$), quando comparados à SGB, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, o estímulo com antígeno de ZIKV mostrou um aumento significativo nos níveis de IL-12 ($P = 0,005$), EOTAXIN ($P = 0,016$), MIG ($P = 0,016$), IL-7 ($P = 0,028$), IL-2 ($P = 0,031$), FGF ($P = 0,032$), IL-5 ($P = 0,035$), TNF- α ($P = 0,042$) (Figura 8A-H). Além desses, o IL-4 ($P = 0,066$) mostrou uma tendência à significância estatística.

Figura 8 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando apenas o histórico de neuroarbovirose sob estímulo de ZIKV

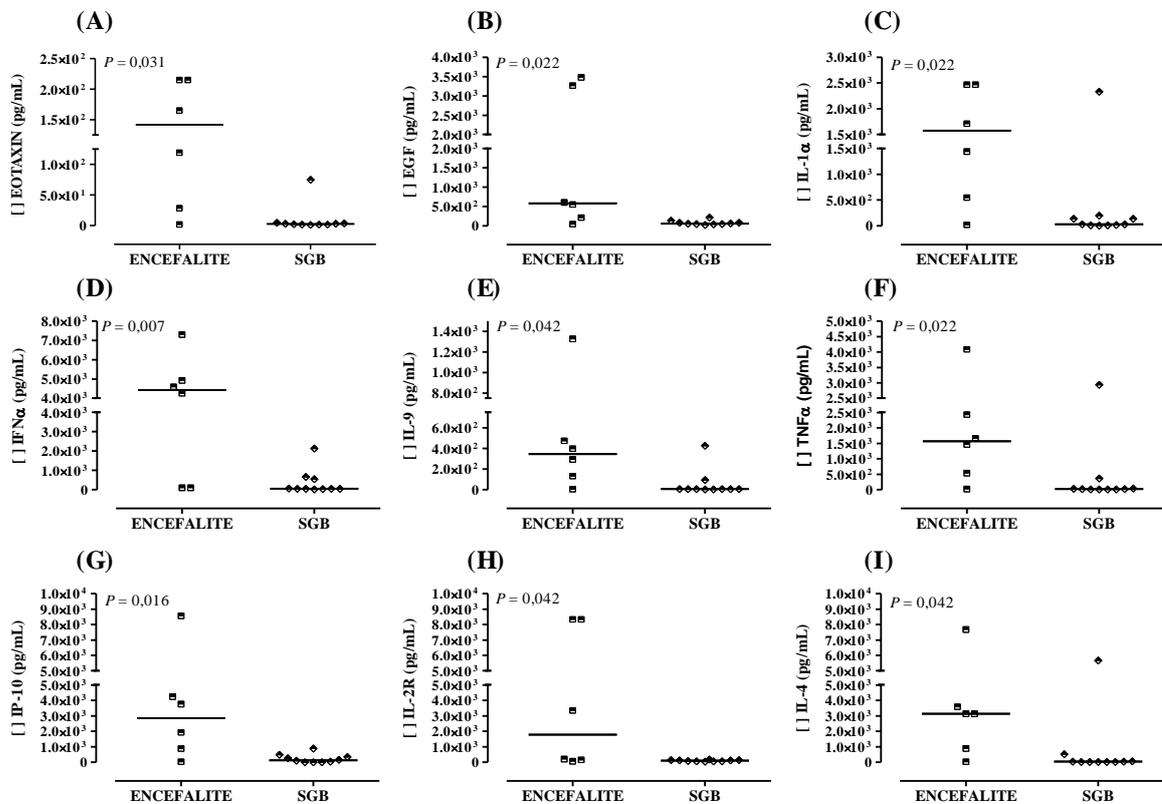


Fonte: O autor.

Legenda: (A-H) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de ZIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite. ENCEFALITE (n = 6) e SGB (n = 10). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Mann-Whitney para os casos não paramétricos e Levene+Teste t (considerando igualdade de variâncias assumidas ou não) para testes paramétricos.

As células mononucleares dos pacientes com histórico de encefalite também responderam ao estímulo com CHIKV aumentando os níveis IFN- α ($P = 0,007$), IP-10 ($P = 0,016$), IL-1 α ($P = 0,022$), TNF- α ($P = 0,022$), EGF ($P = 0,022$), EOTAXIN ($P = 0,031$), IL-2R ($P = 0,042$), IL-9 ($P = 0,042$), IL-4 ($P = 0,042$) (Figura 9A-I). Além desses, outros mediadores demonstram uma tendência à significância estatística: IL-10 ($P = 0,056$), IL-13 ($P = 0,056$), IL-5 ($P = 0,056$), IL-7 ($P = 0,056$), MIG ($P = 0,056$) e IL-15 ($P = 0,074$).

Figura 9 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando apenas o histórico de neuroarbovirose sob estímulo de CHIKV



Fonte: O autor.

Legenda: (A-I) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de CHIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite. ENCEFALITE (n = 6) e SGB (n = 10). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Mann-Whitney para os casos não paramétricos e Levene+Teste t (considerando igualdade de variâncias assumidas ou não) para testes paramétricos.

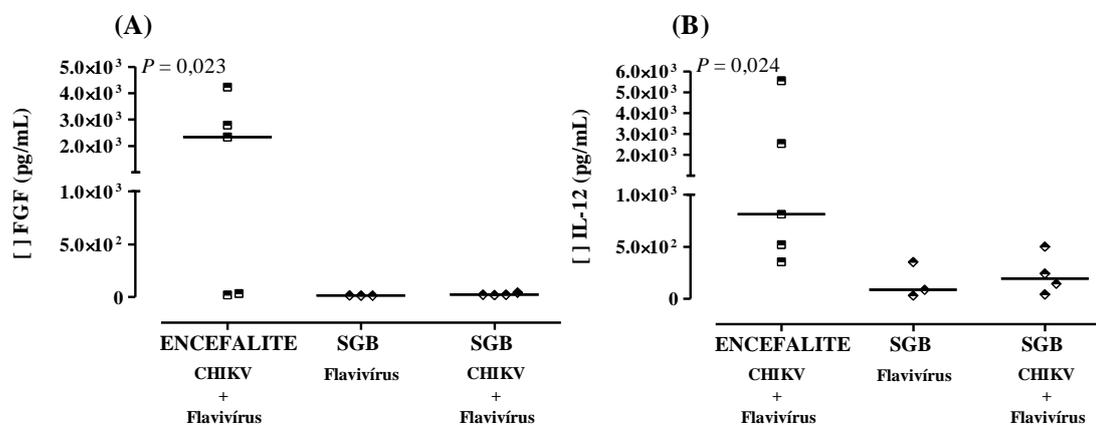
Posteriormente, nós comparamos os níveis dos mediadores solúveis nas culturas dos pacientes com histórico de encefalite por CHIKV (n = 3), ou infecção múltipla por flavivírus e CHIKV (n = 2), e não encontramos diferença estatística ($P > 0,2$), sugerindo que independente da etiologia do agente infeccioso as respostas imunes de memória nos pacientes com histórico de encefalite foram semelhantes. Contudo, comparando os níveis dos mediadores solúveis em cultura de pacientes com histórico de SGB por flavivírus (n = 3), ou infecção múltipla por flavivírus (DENV e ZIKV) e CHIKV (n = 4), encontramos na infecção múltipla o aumento nos níveis de IL-4, IL-2R, IL-7, TNF α , IL-9, IL-17F, HGF, EGF, GM-CSF, Eotaxin e IL-12 em resposta ao estímulo com CHIKV; o aumento de IFN- γ apenas nas culturas estimuladas com antígenos de ZIKV, e ainda o aumento de IL-2, IL-17A, IL-22, IL-13 e FGF em resposta ao estímulo com ambos os antígenos, de CHIKV e ZIKV, mas em todos os

casos a significância estatística não foi atingida ($P = 0,057$) com o número reduzido de amostras analisadas.

Devido à tendência estatística para a diferença nos níveis desses mediadores solúveis na SGB secundária a diferentes agentes etiológicos, nós repetimos a análise da resposta imune de memória considerando três grupos de acordo com o diagnóstico neurológico: encefalite, SGB por flavivírus e SGB por infecção múltipla por flavivírus e CHIKV.

Sob o estímulo do antígeno ZIKV foi visto que as células obtidas de indivíduos portadores de encefalite apresentam aumento na expressão dos mediadores FGF ($P = 0,032$) e IL-12 ($P = 0,024$) (Figura 10A-B). Além desses, observou-se um aumento dos mediadores IL-13 ($P = 0,063$), IL-15 ($P = 0,052$), IL-5 ($P = 0,077$), IFN- γ ($P = 0,077$), IL-7 ($P = 0,054$) e MIG ($P = 0,060$), entretanto sem atingir à significância estatística.

Figura 10 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando histórico de neuroarbovirose secundário à infecção por arbovírus sob estímulo de ZIKV



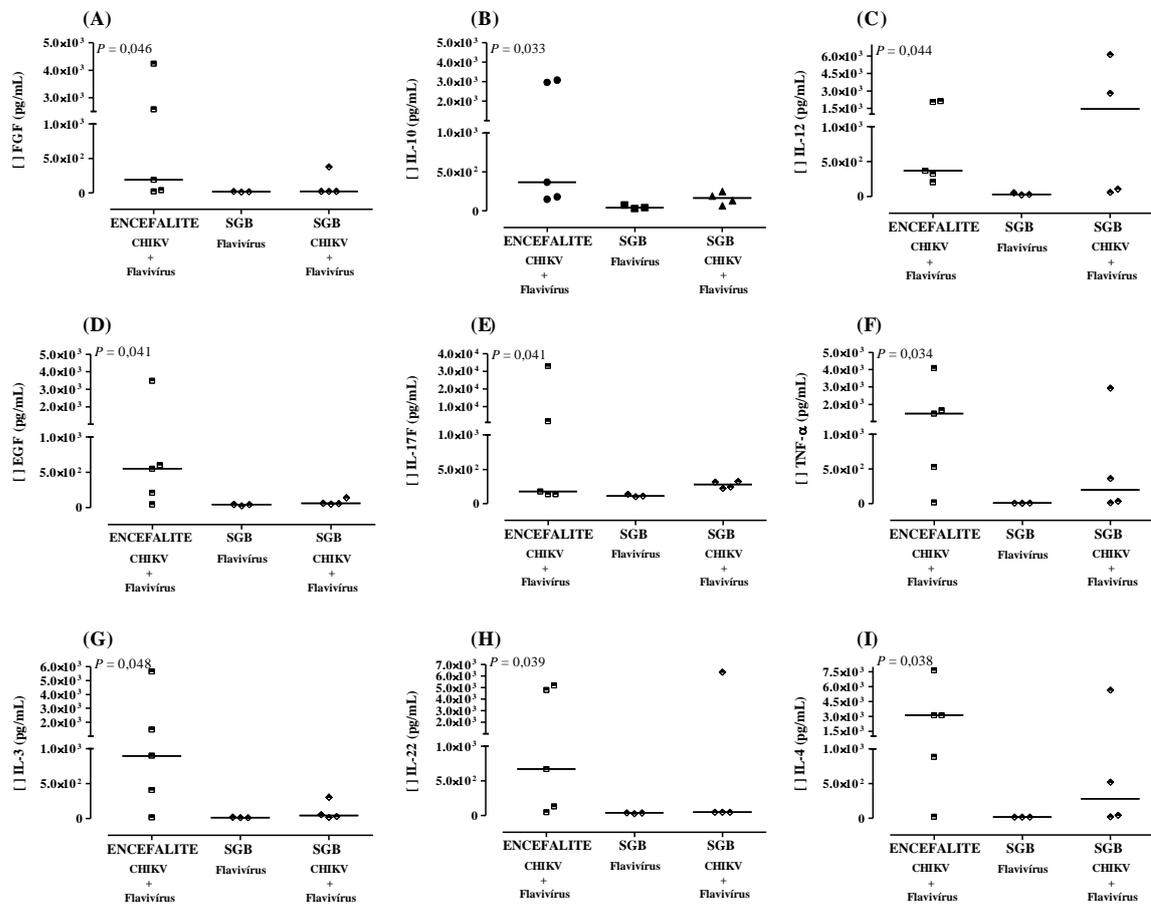
Fonte: O autor.

Legenda: (A-B) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de ZIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite secundária à infecção por CHIKV e flavivírus. ENCEFALITE secundária à infecção por flavivírus + CHIKV ($n = 5$), SGB secundária à infecção por flavivírus ($n = 3$) e SGB secundária à infecção por flavivírus + CHIKV ($n = 4$). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Kruskal-Wallis.

O desafio com o antígeno CHIKV fez com que as células de portadores de encefalite apresentassem aumento na expressão dos mediadores FGF ($P = 0,046$), IL-10 ($P = 0,033$), EGF ($P = 0,041$), IL-17F ($P = 0,041$), TNF- α ($P = 0,034$), IL-3 ($P = 0,048$), IL-22 ($P = 0,039$), IL-4 ($P = 0,038$) (Figura 11A-B;D-I). Já nas células de portadores de SGB, secundária à infecção por CHIKV e flavivírus, foi visto um

aumento de IL-12 ($P = 0,044$) (Figura 11C). Além desses, foram observadas tendências à significância estatística entre os mediadores IL-17A ($P = 0,066$), GMCSF ($P = 0,069$), IL-15 ($P = 0,059$), IL-1 α ($P = 0,071$), IL-9 ($P = 0,056$), IL-1RA ($P = 0,077$), IL-7 ($P = 0,061$) e IL-2R ($P = 0,051$), todos aumentados nas células de portadores de encefalite.

Figura 11 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando histórico de neuroarbovirose secundário à infecção por arbovírus sob estímulo de CHIKV



Fonte: O autor.

Legenda: (A-B; D-I) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de CHIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite secundária à infecção por CHIKV e flavivírus. (C) Mediador solúvel com expressão aumentada em portadores de SGB secundária à infecção por CHIKV e flavivírus ENCEFALITE secundária à infecção por flavivírus + CHIKV ($n = 5$), SGB secundária à infecção por flavivírus ($n = 3$) e SGB secundária à infecção por flavivírus + CHIKV ($n = 4$). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Kruskal-Wallis.

6.5 Proporção entre a mediana dos níveis de mediadores imunológicos solúveis induzidos nas PBMCs de pacientes com histórico de neuroarbovirose submetidas a diferentes estímulos antigênicos (MOCK, ZIKV e CHIKV)

Considerando que a resposta imune induzida nos PBMCs pelos antígenos de arbovírus depende da exposição prévia do indivíduo aos antígenos testados, e que essa exposição depende do diagnóstico etiológico da neuroarbovirose, quer seja por CHIKV, ZIKV/DENV ou ambos, e ainda a apresentação clínica da doença (encefalite ou SGB) pode estar associada a diferenças na qualidade da resposta imune, foi

investigada a proporção entre a mediana dos níveis de cada molécula em diferentes cenários determinado pelo tipo de doença e agente etiológico. Devido a limitação do número de amostras para cada cenário, foram consideradas apenas grupos com pelo menos dois indivíduos, e a diferença nos níveis de moléculas de pelo menos cinco vezes entre as condições testadas.

Em relação aos indivíduos que tiveram SGB secundária a arbovirose, foram comparados os grupos acometidos por CHIKV (SGBchikv (n = 2)), Flavivírus (ZIKV e/ou DENV, SGBflav (n = 3)) ou ambos (CHIKV e Flavivírus, SGBambos (n = 4)) (Apêndice B). As células de indivíduos SGBflav apresentaram resposta ao estímulo MOCK com aumento de sHLA-G (19X e 16X) e MIP-1 α (5X e 7X) em relação aos indivíduos SGBchikv e SGBambos respectivamente. O estímulo MOCK também induziu aumento de 10X e 6X nos níveis RANTES de SGBflav e SGBambos em relação a SGBchikv, e ainda o aumento de 6X e 12X em IL-7, nos indivíduos SGBambos em relação a SGBchikv e SGBflav. Diante desse resultado, as alterações nas proporções dos níveis de sHLA-G, MIP-1 α , RANTES e IL-7 para os indivíduos com histórico de SGB secundária a arbovirose não foram consideradas.

As PBMCs estimuladas com antígeno de ZIKV induziram um aumento nos níveis de IL-2R (10X e 10X), IL-1 β (18X e 26X), IFN- γ (21X e 14X) nos indivíduos SGBambos em relação àqueles SGBflav e SGBchikv, respectivamente. Ademais, os níveis de IL-1 α (7X e 14X), IL-5 (9X e 15X) e IL-6 (4X e 5X) foram respectivamente maiores em SGBchikv e SGBambos em relação aos níveis obtidos em SGBflav, com menor proporção a diferença nos níveis de IL-6 nesse cenário.

Quando as PBMCs foram estimuladas com antígeno de CHIKV, os indivíduos com SGBchikv e SGBambos apresentaram, respectivamente, maiores níveis de IL-1 α (7X e 16X), IL-1 β (7X e 30X), IFN- γ (16X e 89X) do que aqueles com SGBflav. Já os níveis de IL-5, IL-12 e MIG foram maiores nos SGBchikv em relação a SGBflav em 10X, 7X e 9X, respectivamente; maiores nos SGBambos em relação a SGBchikv em 19X, 7X e 6X, respectivamente, e superior em SGBambos em relação a SGBflav atingindo valores de 190X, 49X e 56X, respectivamente, sugerindo um efeito aditivo no caso de sensibilização prévia com CHIKV e Flavivírus. Aumento nos níveis de IL-6 (68X e 27X), IL-1RA (12X e 7X), VEGFA (10X e 5X) e IL-10 (8X e 4X) foram observados nos indivíduos SGBchikv e nos SGBambos em relação àqueles SGBflav respectivamente, os menores valores encontrados nos indivíduos com sensibilização prévia a ambos os arbovírus. O maior aumento de GM-CSF (19X e 46X), IL-13 (16X

e 36X), TNF- α (10X e 20X), IL-4 (7X e 14X), IL-9 (9X e 13X) e IFN- α (7X e 11X) em SGBambos em relação a SGBchikv e SGBflav respectivamente, com um aumento discreto (1,5X - 2,4X) em SGBchikv em relação a SGBflav foi observado. A IL-8 foi a única molécula que apresentou um aumento em SGBflav sob estímulo de CHIKV em relação a SGBchikv (30X) e SGBambos (15X).

Em relação aos indivíduos que tiveram encefalite secundária a arbovirose, foram comparados os grupos com histórico de acometimento por CHIKV (ENCchikv (n = 3)) ou por ambos arbovírus (CHIKV e Flavivírus, ENCambos (n = 2)) (Apêndice C). Os indivíduos ENCchikv apresentaram maiores níveis de IL-3 e IL-15 quando estimulados com MOCK em relação aos indivíduos ENCambos. Por outro lado, os indivíduos ENCambos apresentaram maiores níveis de IFN- α , IL-5, IL-7, IL-10, IL-12, IP-10 do que os ENCchikv em resposta ao MOCK. Adicionalmente, foi observado resposta ao MOCK com produção de RANTES, IL-6, HGF, IL-17F, entretanto os níveis produzidos pelas células de indivíduos com antígeno de arbovírus foi muito superior ao inespecífico induzido pelo MOCK e, portanto, foram considerados na análise.

Os indivíduos ENCambos apresentaram três tipos de resposta ao desafio antigênico quando comparados aos ENCchikv. Na primeira, foi observado o aumento dos níveis de mediadores imunes aos estímulos antígeno ZIKV e CHIKV, com a maior produção de RANTES (1024X e 1822X), IL-6 (333X e 119X), MCP-1 (45X e 188X) e IL-8 (6X e 27X) respectivamente. Na segunda, foi observado apenas o aumento de mediadores ao estímulo com antígeno de ZIKV, com maiores níveis de HGF (22X), MIP-1 α (9X) e IL-13 (8X). E na terceira, foi observado aumento de moléculas imunes apenas em resposta ao estímulo com CHIKV, com maiores níveis de IL-17F (123X), IL-1RA (90X), IFN- γ (27X), FGF (11X) e MIP-1 β (7X), respectivamente.

Os indivíduos ENCchikv apresentaram níveis de IL-22 (12X) e IL-2 (36X) superiores aos observados nos ENCambos em resposta ao estímulo com antígenos de CHIKV; e níveis de TNF- α (42X), IL-2R (14X), MIG (11X), GM-CSF (10X), IL-1 α (10X), IL-1 β (8X), IL-9 (9X) em resposta ao estímulo com antígeno de ZIKV.

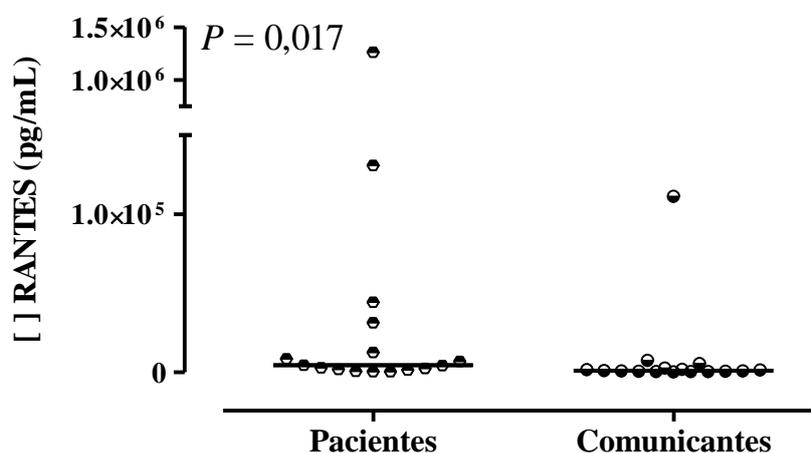
Esses resultados mostram a complexidade das respostas imunes de memória dos pacientes com diferentes exposições prévias aos arbovírus, mas alguns pontos podem ser ressaltados, como nos pacientes que tiveram encefalite secundária a CHIKV e apresentaram resposta ao antígeno de CHIKV com o aumento da produção

de IL-22 e IL-2, e também o fato dos pacientes com histórico de encefalite por infecção múltipla terem respondido tanto ao estímulo por ZIKV e CHIKV com os maiores níveis de RANTES, IL-6, MCP-1 e IL-8.

6.6 Perfil imunológico de pacientes com histórico de neuroarbovirose em relação ao seu comunicante intradomiciliar

A resposta imune de memória de pacientes com histórico de neuroarboviroses, encefalite e SGB, em relação a resposta de seu comunicante intradomiciliar não geneticamente relacionado (cônjuge), exposto a fonte de infecção, mas sem a doença clínica, foi avaliada em PBMCs frente ao desafio com os estímulos ZIKV e CHIKV. Na presença do estímulo com CHIKV, os pacientes apresentaram uma tendência estatística ao aumento da expressão de MIP-1 α ($P = 0,073$); enquanto o estímulo com ZIKV induziu um aumento na expressão de RANTES ($P = 0,017$) (Figura 12).

Figura 12 – Perfil imunológico de pacientes com histórico de neuroarbovirose em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulo de ZIKV



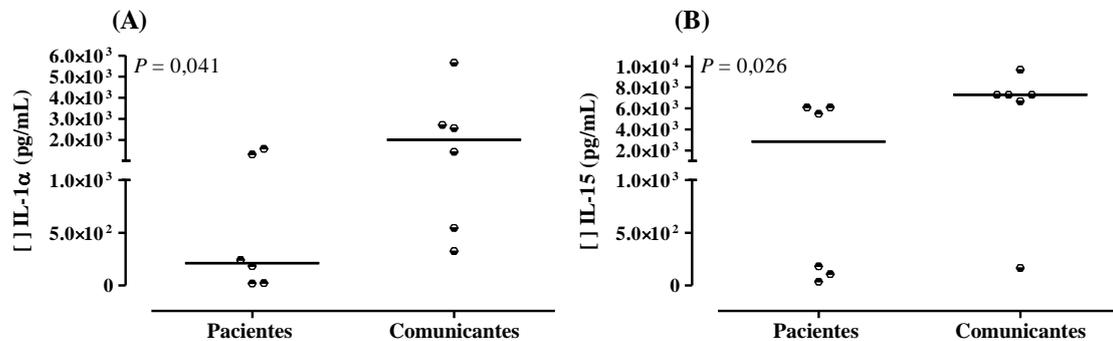
Fonte: O autor.

Legenda: Mediador solúvel diferencialmente expresso sob estímulo de ZIKV e que demonstra aumento nos casos de pacientes portadores de neuroarbovirose. Pacientes e comunicantes ($n = 16$, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Mann-Whitney.

Em relação a encefalite, os comunicantes apresentaram aumento dos níveis de IL-1 α ($P = 0,041$) no sobrenadante das culturas estimuladas com antígenos de

ZIKV (Figura 13A), e de IL-15 ($P = 0,026$) quando o estímulo foi o antígeno de CHIKV (Figura 13B) em relação aos seus respectivos familiares com encefalite.

Figura 13 – Perfil imunológico de pacientes com histórico de encefalite, secundária a infecção por arbovírus, em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulos de ZIKV e CHIKV

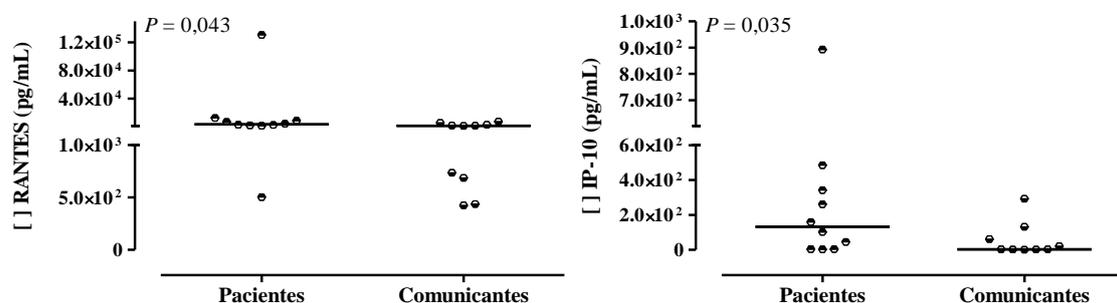


Fonte: O autor.

Legenda: (A) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de ZIKV em relação a pacientes com encefalite secundária à infecção por arbovírus. (B) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de CHIKV em relação a pacientes com encefalite secundária à infecção por arbovírus. Pacientes e comunicantes ($n = 6$, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Mann-Whitney.

Por outro lado, os pacientes com histórico da SGB apresentaram aumento dos níveis de RANTES ($P = 0,043$) em sobrenadante da cultura de PBMCs estimuladas com antígeno de ZIKV (Figura 14A), e aumento nos níveis de IP-10 ($P = 0,035$) ao estímulo com antígenos de CHIKV (Figura 14B), em relação aos níveis obtidos com PBMCs dos seus comunicantes intradomiciliares.

Figura 14 – Perfil imunológico de pacientes com histórico de SGB, secundária a infecção por arbovírus, em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulos de ZIKV e CHIKV



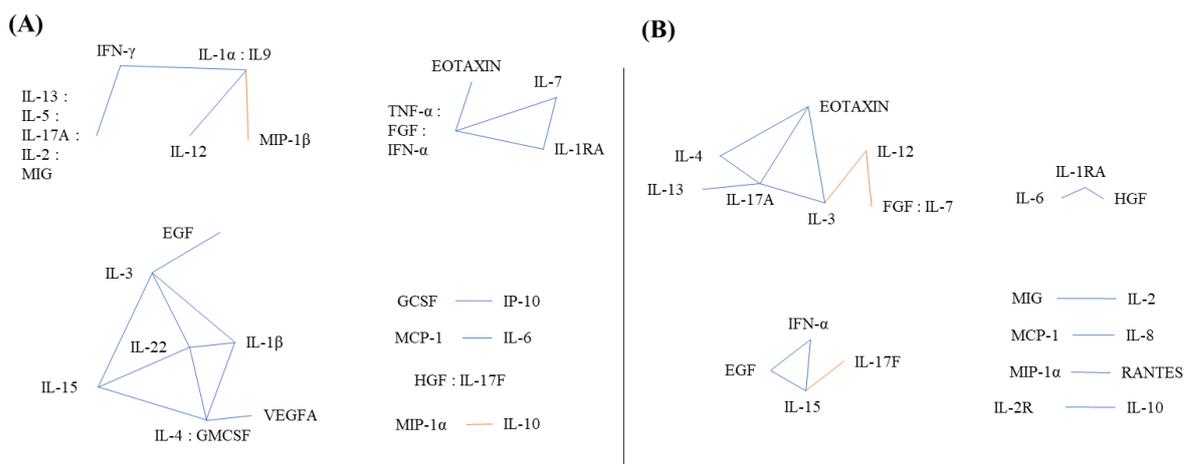
Fonte: O autor.

Legenda: (A) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de ZIKV em relação a pacientes com SGB secundária a infecção por arbovírus. (B) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de CHIKV em relação a pacientes com SGB secundária a infecção por arbovírus. Pacientes e comunicantes ($n = 10$, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Mann-Whitney.

6.7 Correlações dos mediadores imunológicos solúveis induzidos nas PBMCs de pacientes com histórico de neuroarbovirose e seus comunicantes, submetidas a diferentes estímulos antigênicos (ZIKV e CHIKV)

Estudo de correlação recíproca de moléculas solúveis produzidas por PBMCs de pacientes com histórico de encefalite secundária à infecção por arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV), e induzidas por antígenos de ZIKV em cultura de tecido (Figura 15A) foi realizado em paralelo ao estudo com células dos seus comunicantes intradomiciliares (Figura 15B). A representação gráfica das correlações positivas e negativas com $\rho > 0.9$ e $P < 0,01$ destacam um maior conjunto de moléculas com correlação perfeita ($\rho = 1$) no grupo de pacientes com encefalite sob o estímulo de antígenos ZIKV. A redução relativa nos pacientes dos níveis de IL-1 α em relação a seus comunicantes está correlacionada positivamente aos níveis de IL-9, IL-12 e IFN- γ e negativamente aos níveis de MIP-1 β . A rede de moléculas reciprocamente relacionadas nos comunicantes não apresenta a influência de IL-1 α , apesar de ela está relativamente aumentada. Todos os comunicantes de pacientes de encefalite foram positivos para IgG anti-flavivírus.

Figura 15 – Estudo de correlação dos mediadores solúveis expressos em PBMCs de pacientes com histórico de encefalite e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de ZIKV



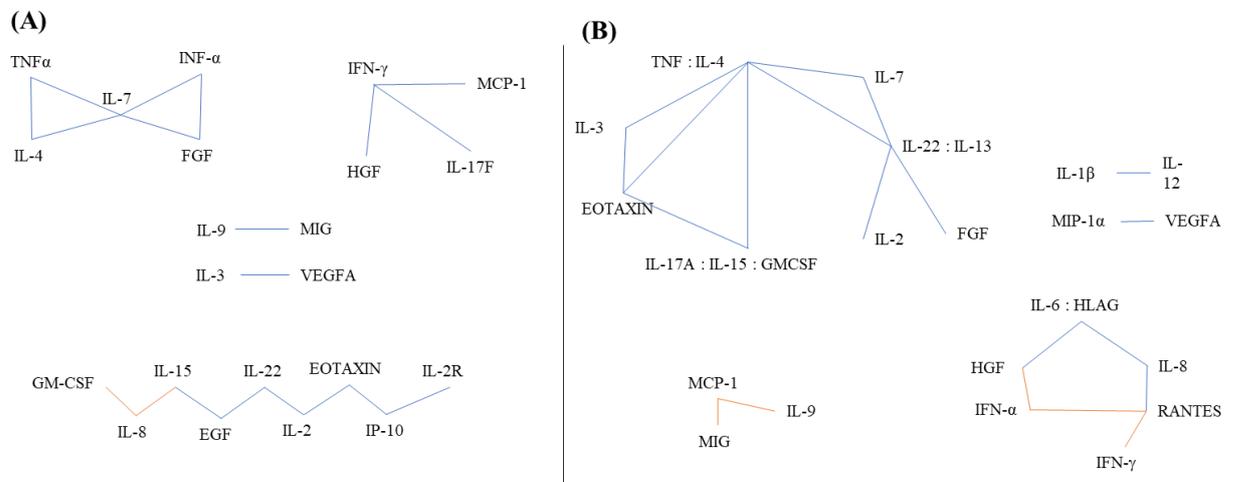
Fonte: O autor.

Legenda: (A) Correlações existentes entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de pacientes com histórico de encefalite diante do desafio com ZIKV (B) Correlações existente entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de comunicantes intradomiciliares de pacientes com histórico de encefalite diante do desafio com ZIKV. Pacientes e comunicantes (n = 6, cada). Teste utilizado: Coeficiente de Correlação de Spearman, apenas $\rho > 0.9$ e $P < 0,01$ foram considerados. Duas ou mais moléculas separadas por (:) significa correlação de 1 (comportamento idêntico), moléculas separadas por (/) têm correlação

semelhante para todas as moléculas em graus diferentes, mas todas acima de 0,9 (muito forte). Linhas em azul correspondem a correlação positiva, e em laranja corresponde a correlação negativa.

Em relação ao estímulo com CHIKV, os comunicantes apresentam um aumento de IL-15 e uma correlação positiva ($\rho=1$) com IL-17A e GMCSF, já nos pacientes de encefalite os níveis de IL-15 e GMCSF apresentam correlação negativa com IL-8 (Figura 16). Outra diferença é que nos pacientes a correlação positiva entre MIG e IL-9, enquanto nos comunicantes o nível de MCP-1 exerce correlação negativa sobre o MIG e o IL-9. Ademais, os níveis de sHLA-G e IL-6 exercem correlação positiva sob a quimiocina IL-8 e indiretamente correlação negativa com moléculas antivirais IFN- α e IFN- γ . Dois comunicantes de pacientes com encefalite, um por CHIKV e outro com infecção mista, apresentaram positividade para IgG anti-CHIKV.

Figura 16 – Estudo de correlação dos mediadores solúveis expressos em PBMCs de pacientes com histórico de encefalite e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de CHIKV



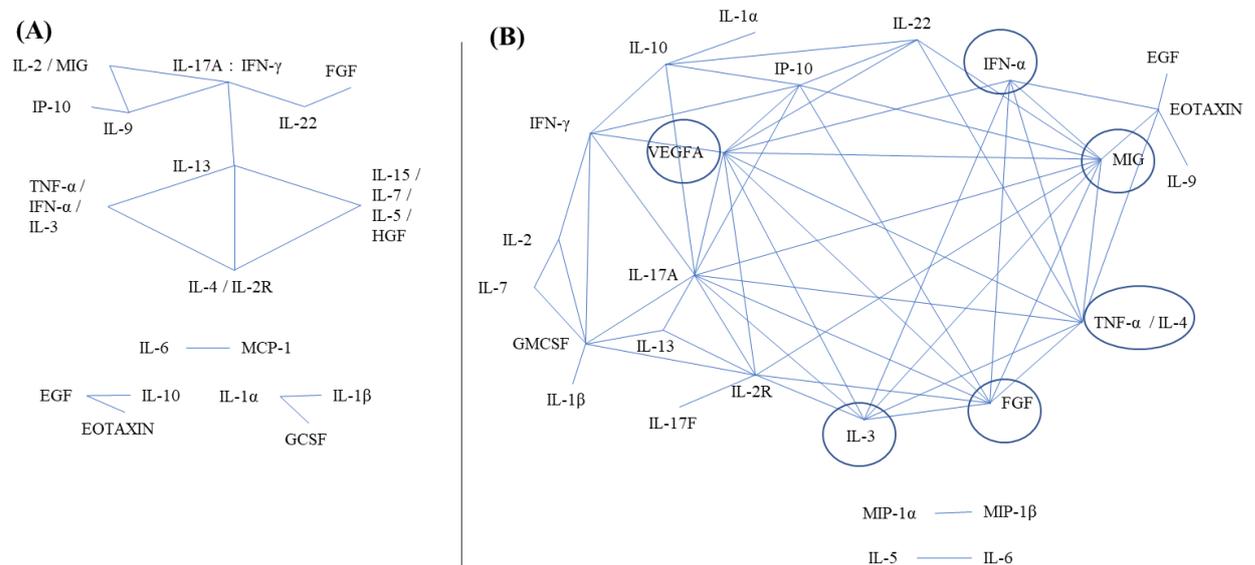
Fonte: O autor.

Legenda: (A) Correlações existentes entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de pacientes com histórico de encefalite diante do desafio com CHIKV (B) Correlações existente entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de comunicantes intradomiciliares de pacientes com histórico de encefalite diante do desafio com CHIKV. Pacientes e comunicantes ($n = 6$, cada). Teste utilizado: Coeficiente de Correlação de Spearman, apenas $\rho > 0.9$ e $P < 0,01$ foram considerados. Duas ou mais moléculas separadas por (:) significa correlação de 1 (comportamento idêntico), moléculas separadas por (/) têm correlação semelhante para todas as moléculas em graus diferentes, mas todas acima de 0,9 (muito forte). Linhas em azul correspondem a correlação positiva, e em laranja corresponde a correlação negativa.

A correlação recíproca de moléculas solúveis em cultura de PBMCs induzida com antígeno ZIKV também foi avaliada nos pacientes com SGB e seus comunicantes (Figura 17). Apenas um comunicante de paciente com SGB causado

por CHIKV foi negativo para IgG anti-flavivirus e anti-CHIKV. Outro comunicante de paciente com SGB causada por infecção mista testou positivo para IgG anti-CHIKV. Sob o estímulo de antígenos de ZIKV, foi observado um aumento de RANTES nos pacientes, mas a sua influência sobre os níveis de outros mediadores solúveis não foi forte pelos critérios adotados na análise. Entretanto, observa-se que a complexidade das interações entre as moléculas solúveis identificadas nos comunicantes ficou mais ordenada do que nos pacientes, que apresentaram vários grupos de moléculas com correlações positivas perfeitas ($\rho=1$), sugerindo uma diferenciação na resposta imune desses pacientes.

Figura 17 – Estudo de correlação dos mediadores solúveis expressos em PBMCs de pacientes com histórico de SGB e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de ZIKV

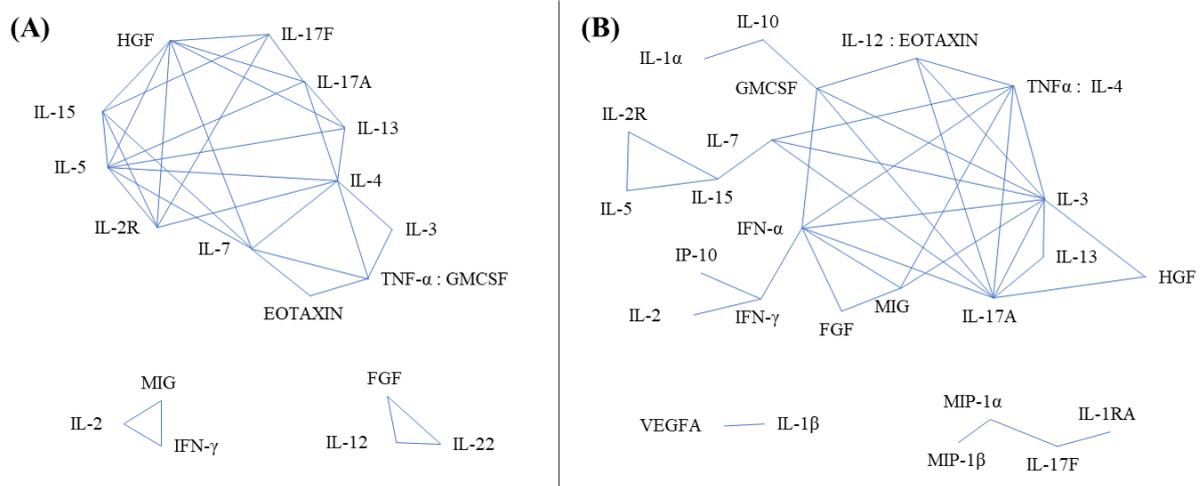


Fonte: O autor.

Legenda: (A) Correlações existentes entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de pacientes com histórico de SGB diante do desafio com ZIKV (B) Correlações existente entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de comunicantes intradomiciliares de pacientes com histórico de SGB diante do desafio com ZIKV. Pacientes e comunicantes ($n = 10$, cada). Teste utilizado: Coeficiente de Correlação de Spearman, apenas $\rho > 0,9$ e $P < 0,01$ foram considerados. Duas ou mais moléculas separadas por (:) significa correlação de 1 (comportamento idêntico), moléculas separadas por (/) têm correlação semelhante para todas as moléculas em graus diferentes, mas todas acima de 0,9 (muito forte). Linhas em azul correspondem a correlação positiva, e em laranja corresponde a correlação negativa.

Ainda considerando a SGB, a correlação recíproca das moléculas solúveis produzidas pelas PBMCs induzidas por antígenos de CHIKV em cultura de tecido mostrou redução no número de moléculas na rede de correlação exercendo influência umas sobre as outras, e não associada ao aumento da IP-10 observado (Figura 18).

Figura 18 – Estudo de correlação dos mediadores solúveis expressos em PBMCs de pacientes com histórico de SGB e seus respectivos comunicantes diante de antígenos de CHIKV



Fonte: O autor.

Legenda: (A) Correlações existentes entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de pacientes com histórico de SGB diante do desafio com CHIKV (B) Correlações existente entre os mediadores solúveis expressos no sobrenadante da cultura de PBMCs de comunicantes intradomiciliares de pacientes com histórico de SGB diante do desafio com CHIKV. Pacientes e comunicantes ($n = 10$, cada). Teste utilizado: Coeficiente de Correlação de Spearman, apenas $\rho > 0,9$ e $P < 0,01$ foram considerados. Duas ou mais moléculas separadas por (:) significa correlação de 1 (comportamento idêntico), moléculas separadas por (/) têm correlação semelhante para todas as moléculas em graus diferentes, mas todas acima de 0,9 (muito forte). Linhas em azul correspondem a correlação positiva, e em laranja corresponde a correlação negativa.

7 DISCUSSÃO

O perfil de expressão de 36 moléculas solúveis foi avaliado em 16 pacientes com manifestações neurológicas (encefalite e SGB) secundárias a infecção por arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) e seus respectivos comunicantes. Os pacientes com neuroarbovirose estavam na fase convalescente da infecção, diante disso, o perfil de mediadores produzidos por suas PBMCs estimuladas com antígenos de diferentes arbovírus correspondem a uma avaliação da imunidade de memória desses indivíduos; além disso, comparamos o perfil de mediadores produzidos pela análise dos PBMCs dos seus comunicantes intradomiciliares não geneticamente relacionados (cônjuge), a fim de verificar a diferença na modulação da resposta imunológica que possa ter contribuído para o desenvolvimento do quadro neurológico, assumindo que ambos paciente e comunicante tiveram o mesmo grau de exposição viral.

A principal limitação desse estudo é o número de duplas paciente/comunicante analisado, em consequência às dificuldades no recrutamento dos cônjuges devido a sua atividade laboral e a distância do hospital. O agendamento com duplas de participantes foi realizado por telefone e de forma recorrente cancelado pela dificuldade de deslocamento dos voluntários da pesquisa. Outro limitante foi a execução do experimento, desenhado para avaliar simultaneamente a imunidade humoral e a imunidade celular (não apresentada) das PBMCs dos pacientes e comunicantes em seis diferentes condições de crescimento, onde o tempo de experimentação completa é de uma semana, sendo possível realizar no máximo duas duplas por semana. Ainda, os pacientes variaram em relação a apresentação clínica da doença, encefalite ou SGB, e a infecção quanto ao agente etiológico único ou múltiplo, tendo contribuído para que as respostas imunológicas de memória desses indivíduos se apresentassem de forma complexa e variável. Como consequência dessa variabilidade mesmo analisando as medianas dos níveis dos mediadores solúveis não foi possível atingir a significância em algumas análises, desta forma optamos por analisar o perfil de expressão das diferentes moléculas comparando a proporção entre as medianas das moléculas nas diferentes análises realizadas.

Os níveis de 21 das 36 moléculas estudadas em sobrenadante de PBMCs de pacientes de encefalite desafiados com estímulo MOCK foram superiores em 50X ou

mais aos níveis obtidos dos pacientes de SGB, sugerindo a maior responsividade imunológica dos pacientes que desenvolveram encefalite secundária a arbovirose. Os pacientes de encefalite por infecção múltipla tiveram uma resposta imune primária aos estímulos MOCK superior àqueles que tiveram monoinfecção por CHIKV, com o aumento de quimiocinas (RANTES e IP-10), citocinas inflamatórias (IL-6, IL-1 α e IL-1 β), com propriedades antivirais (IFN- α), proliferativa (IL-5, IL-7 e IL-22) e reguladora (IL-12 e IL-10). Por outro lado, a resposta primária ao estímulo MOCK dos pacientes de SGB foi menos intensa, e envolveu as quimiocinas MIP-1 α e RANTES, a citocina IL-7 e a molécula imunológica HLA-Gs. Esse aumento dos níveis de HLA-Gs ao estímulo MOCK pode estar relacionado às características genéticas dos pacientes. A expressão da molécula HLA-G está associada a presença de sítios polimórficos nas regiões reguladoras dos gene *HLA-G* (CASTELLI et al, 2010). A molécula de HLA-Gs tem efeito inibitório sobre diferentes etapas do processo da imunidade inata e adaptativa, sendo considerada uma molécula de decisão que modula a resposta imunológica nas diferentes situações fisiológicas e patológicas (DONADI et al., 2011). Em estudo prévio, nosso grupo demonstrou baixos níveis de sHLA-G e altos níveis de quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento no soro de pacientes, na fase aguda da doença, em relação aos níveis encontrados no soro dos mesmos pacientes após a recuperação clínica da doença, entretanto nesse artigo não foi mostrado o perfil dessas moléculas em relação ao acometimento central da encefalite ou periférico da SGB (ALMEIDA et al., 2021). Diante do exposto, é possível que os pacientes que desenvolveram encefalite possuam uma constituição genética que permite a eles desenvolverem uma resposta imunológica mais intensa a agentes infecciosos.

Quanto a resposta de memória dos pacientes de encefalite por infecção múltipla, nós observamos moléculas que tiveram seus níveis elevados de forma semelhante aos antígenos ZIKV e CHIKV, são elas RANTES, IL-6, MCP-1 e IL-8. A acentuada diferença na proporção dos níveis de RANTES (50X, 1024X e 1822X) em resposta ao MOCK e aos antígenos ZIKV e CHIKV respectivamente por aqueles indivíduos com infecção múltipla, ressalta a importância dessa quimiocina na resposta imune inata e na resposta de memória (GIUNT et al., 2003; MARQUES et al., 2013; SCHALL et al., 1990). O aumento nos níveis de IL-8 e MCP-1 também foi descrito no soro e, juntamente com a IL-6, no LCR de pacientes na fase aguda da neuroarbovirose (ALMEIDA et al., 2021). Interessante é o fato de pacientes de SGB

apresentarem menor expressão de RANTES em relação aqueles de encefalite, sendo que os pacientes de SGB por flavivírus apresentaram maiores níveis de RANTES como resposta ao antígeno MOCK do que ao estímulo ZIKV (10X e 3X respectivamente) em relação aos pacientes de SGB por CHIKV, destacando o papel de RANTES na resposta imune inata ao MOCK (MARQUES et al., 2013), sugerindo também uma menor resposta de memória ao estímulo ZIKV, apesar dos níveis de RANTES nos pacientes de SGB foram significativamente maiores em relação aqueles produzidos pelas células dos seus comunicantes (GIUNT et al., 2003; SCHALL et al., 1990). Por outro lado, a resposta de memória dos pacientes de SGB por CHIKV foi caracterizada por um aumento de 68X nos níveis de IL-6 ao estímulo CHIKV comparado a resposta dos pacientes de SGB por ZIKV. Outro fato interessante é o estímulo com CHIKV induzir o aumento nos níveis de IL-8 nos pacientes de SGB por flavivírus não observado na resposta ao estímulo por ZIKV ou MOCK (30X, 0,6X e 0,9X respectivamente), sugerindo a maior capacidade antigênica e imunogênica do CHIKV em promover uma resposta imune primária e de memória mais intensa (FOX, DIAMOND, 2016; GASQUE et al., 2016).

Em relação aos pacientes de encefalite por CHIKV, eles responderam a todos os estímulos MOCK, ZIKV e CHIKV com aumento da expressão de IL-15 em relação aos pacientes de encefalite por infecção mista (flavivírus e CHIKV), isso pode ser explicado pelo papel da IL-15 na manutenção dos linfócitos T CD8+ de memória (BERARD et al. 2003; KENNEDY et al., 2000). Adicionalmente, foi observado o aumento dos níveis das citocinas inflamatórias IL-2 e IL-22 apenas em resposta ao estímulo CHIKV. As IL-15 e IL-2 são citocinas pleiotrópicas que compartilham o mesmo receptor (IL-2R γ) e estão envolvidas na resposta na resposta imune inata e celular. Na imunidade inata, a IL-15 atrai neutrófilos para o sítio de infecção (GIRARD, BOIANI, BEAULIEU, 1998), induz a diferenciação e sobrevivência das células NK, induzindo-as a produção de IFN- γ (MRÓZEK, ANDERSON, CALIGIURI, 1996; WALDMANN, TAGAYA, 1999); induz a produção de IL-8 e MCP-1 por monócitos, duas quimiocinas que atraem neutrófilos e monócitos, respectivamente, para os locais de infecção (BADOLATO et al., 1997). A sua importância na resposta imune celular dar-se pela atração seletiva que promove em linfócitos T, mas não nos linfócitos B (PERERA et al., 2012). A análise da resposta de memória dos pacientes de encefalite em relação aos seus comunicantes mostrou um aumento significativo nos níveis de IL-15 nos comunicantes ao estímulo CHIKV associado a correlação

positiva ($\rho=1$) com GM-CSF e IL-17A, além de um maior aumento, mas não significativo, nos níveis de IL-2 e IL-22, o que poderia sugerir uma resposta primária acentuada nos comunicantes, considerando que apenas dois dos seis analisados foram positivos para IgG anti-CHIKV. Por outro lado, a menor capacidade de resposta de memória com a síntese de IL-15 associada a correlação negativa com IL-8 nos pacientes de encefalite pode significar que um mecanismo de proteção a segunda infecção, visto que na literatura foi relatado a associação de baixos níveis de IL-15 com resposta anti-inflamatória mediada por IL-10, e altos níveis de IL-15 com aumento da expressão de citocinas inflamatórias como IL-1, IL-6 e TNF (PERERA et al., 2012).

Ao estímulo de ZIKV, a resposta imune dos pacientes de encefalite por CHIKV foi caracterizada por maiores níveis de IL-1 α , IL-1 β , TNF- α , GM-CSF, IL-9, e IL-2R do que aqueles pacientes de encefalite por infecção múltipla, explicado em parte como perfil de resposta primária a antígenos ZIKV, corroborando com a hipótese de que esses pacientes que tiveram encefalite por CHIKV apresentam características genéticas associadas a maior reatividade a antígenos estranhos, desenvolvendo uma resposta inflamatória exacerbada (BURT et al., 2017; MEHTA et al., 2018). Os comunicantes dos pacientes de encefalite também responderam ao antígeno ZIKV com aumento desses mediadores inflamatórios em menor intensidade, com maior diferença nos níveis de IL-1 α nos comunicantes ($P = 0,041$). Esses mediadores induzem uma resposta pró-inflamatória, atuando no recrutamento de células efetivas como os linfócitos T e NK, além de promover a produção de mais mediadores inflamatórios; além disso já foi visto que a IL-1 α interage diretamente no SNC induzindo febre, combinadas essas ações sugerem uma ativação massiva da resposta imune inata, na tentativa de debelar a infecção (COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010).

Quando essa comparação foi realizada entre os portadores de SGB e seus comunicantes, foi visto um aumento das quimiocinas RANTES e IP-10 nos pacientes sob os estímulos de ZIKV e CHIKV respectivamente, mas nenhuma diferença na expressão delas foi observada quando comparamos os achados em pacientes de SGB por flavivirus e SGB por CHIKV. Esses mediadores atuam no recrutamento de células efetoras do sistema imunológico, entretanto, quando em excesso, podem promover danos no sistema neurológico, inclusive, conforme mencionado no referencial teórico, a quimiocina IP-10 tem sido apontada como responsável pela

apoptose de células neurais na SGB, além de ter sido visto um aumento significativo dessa quimiocina em mulheres gestantes portando fetos com mal formação congênita (microcefalia) associada à arbovírus (ZIKV) (COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010; KAM et al., 2017; NAVECA et al., 2018; TAPPE et al. 2015).

Os pacientes de SGB por CHIKV ou por infecção múltipla apresentaram níveis superiores de vários mediadores aos diferentes estímulos quando comparados aos achados com pacientes de SGB mono infectado por flavivírus sugerindo independente da apresentação clínica da doença neurológica a maior imunogenicidade aos antígenos de CHIKV. A resposta de memória dos pacientes de SGB por CHIKV frente ao desafio com antígenos de CHIKV foi caracterizada pelo aumento das moléculas IL-1 α , IL-1 β , IL-6, IL-5, IFN- γ , VEGFA, IL-1RA, IL-10, IL-12 e MIG em relação a resposta primária dos pacientes de SGB por flavivírus, que apresentou apenas o aumento de IL-1 α e IL-5 em resposta aos experimentos com antígenos de ZIKV, mostrando o perfil inflamatório, antiviral e imunoregulador da resposta de memória dos pacientes de SGB previamente sensibilizados com a infecção por CHIKV (BURT et al., 2017; COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010). Além disso, a resposta ao antígeno CHIKV dos pacientes SGB por flavivírus ou por CHIKV mostraram níveis semelhantes de TNF, GMCSF, IL-13, IFN- α , IL-9 e IL-4, entretanto, os níveis dessas moléculas foram entre 12X e 45X mais elevados nos pacientes com SGB por infecção múltipla em relação aos SGB por flavivírus e entre 7X e 20X em relação aos SGB por CHIKV, sugerindo uma ação aditiva a resposta de memória quando o indivíduo foi previamente sensibilizado por ambos arbovírus.

Apesar das limitações do presente estudo, alguns importantes aspectos da patogênese da doença foram esclarecidos. A maior frequência de encefalite causada por CHIKV e de SGB por ZIKV descrita na literatura (FERREIRA et al., 2020), pode ser explicada pela maior antigenicidade do CHIKV, resultando na expressão de mediadores inflamatórios de forma exacerbada, incluindo RANTES, IL-8, MCP-1 e IL-6, que contribui para a permeabilidade da barreira hematoencefálica, mas também associado a uma menor ou mais lenta resposta antiviral em decorrência de menores níveis de IL-15 em resposta ao desafio antigênico com CHIKV, conforme demonstramos em relação ao desafio das células dos comunicantes (ALMEIDA et al., 2021; MEHTA et al., 2018). Já nos pacientes de SGB a resposta a arbovírus foi caracterizada pela maior produção de quimiocinas RANTES e IP-10 em relação aos comunicantes, com aparente resposta antiviral

semelhante aos dos comunicantes, talvez porque os comunicantes e pacientes já tinham entrado em contato com DENV, endêmico na região, que pelo compartilhamento de epítomos antigênicos com ZIKV, tenha induzido uma resposta de memória semelhante em todos os participantes.

8 CONCLUSÃO

O perfil de expressão dos mediadores solúveis da resposta imunológica varia de acordo com o agente infeccioso, que influencia na apresentação clínica da doença. Também foi observado que os antígenos de CHIKV apresentaram uma maior antigenicidade em indivíduos não sensibilizados e demonstraram ser mais imunogênicos naqueles indivíduos já sensibilizados.

Além disso, foi constatado que a encefalite está associada à expressão exacerbada dos mediadores solúveis, possivelmente devido a fatores genéticos que tornam esses indivíduos extremamente responsivos a antígenos e a uma menor eficiência na resposta antiviral, que foi comprovada no sobrenadante de PBMCs dos comunicantes que apresentaram aumento de IL-15 em relação as PBMCs dos pacientes com histórico de encefalite.

REFERÊNCIAS

- ALCON, S. *et al.* Enzyme-linked immunosorbent assay specific to dengue virus type 1 nonstructural protein NS1 reveals circulation of the antigen in the blood during the acute phase of disease in patients experiencing primary or secondary infections. Journal of Clinical Microbiology, Washington, v. 40, n. 2, p. 376–381, fev. 2002.
- ALMEIDA, R. S. *et al.* Cytokines and Soluble HLA-G Levels in the Acute and Recovery Phases of Arbovirus-Infected Brazilian Patients Exhibiting Neurological Complications. Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 12, mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33776990/>. Acesso em: 20 out. 2021.
- ARAUJO, L. M.; FERREIRA, M. L. B.; NASCIMENTO, O. J. M. Guillain-Barré syndrome associated with the Zika virus outbreak in Brazil. Arquivos de Neuro-Psiquiatria, São Paulo, v. 74, n. 3, p. 253–255, mar. 2016.
- BADOLATO, R. *et al.* Interleukin-15 (IL-15) induces IL-8 and monocyte chemotactic protein 1 production in human monocytes. Blood, The Journal of the American Society of Hematology, Washington, v. 90, n. 7, p. 2804-2809, out. 1997.
- BERARD, M. *et al.* IL-15 promotes the survival of naive and memory phenotype CD8+ T cells. The Journal of Immunology, Rockville, v. 170, n. 10, p. 5018-5026, maio 2003.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+3+-+Critérios+Diagnósticos+de+Infecção+Associada+à+Assistência+à+Saúde+Neonatalogia/9fa7d9be-6d35-42ea-ab48-bb1e068e5a7d>. Acesso em: 6 maio 2021.
- BURT, F. J. *et al.* Chikungunya virus: an update on the biology and pathogenesis of this emerging pathogen. The Lancet. Infectious Diseases, New York, v. 17, n. 4, p. e107-e117, abr. 2017.
- CAGLIOTI, C. *et al.* Chikungunya virus infection: an overview. New Microbiologica, Pavia, v. 36, n. 3, p. 211–227, maio 2013.
- CALVO, E. P. *et al.* Easy and inexpensive molecular detection of dengue, chikungunya and zika viruses in febrile patients. Acta Tropica, Basel, v. 163, p. 32–37, nov. 2016.
- CAROD-ARTAL, F. J. *et al.* Neurological complications of dengue virus infection. The Lancet. Neurology, London, v. 12, n. 9, p. 906–919, set. 2013.
- CASTELLI, E. C. *et al.* The genetic structure of 3' untranslated region of the HLA-G gene: polymorphisms and haplotypes. Genes & Immunity, Basingstoke, v. 11, n. 2, p. 134-141, out. 2009-2010.
- CASTILLO-MÉNDEZ, M.; VALVERDE-GARDUÑO, V. Aedes aegypti Immune Response and Its Potential Impact on Dengue Virus Transmission. Viral Immunology, New York, v. 33, n. 1, p. 38–47, fev. 2020.
- CERNY, T. *et al.* The Range of Neurological Complications in Chikungunya Fever. Neurocritical Care, Totowa, v. 27, n. 3, p. 447–457, maio 2017.

COLAVITA, F. *et al.* ZIKV infection induces an inflammatory response but fails to activate types I, II, and III IFN response in human PBMC. Mediators of Inflammation, [s. l.], v. 2018, p. 1-6, jun. 2018. Disponível em: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2018/2450540/>. Acesso em: 16 abr. 2022.

COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. Journal of Allergy and Clinical Immunology, St. Louis, v. 125, n. 2, p. S53–S72, fev. 2010.

CORDEIRO, M. T. *et al.* Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. The Lancet, [s. l.], v. 387, n. 10030, p. 1811-1812, abr. 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)30253-7](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)30253-7). Acesso em: 16 abr. 2022.

DE OLIVEIRA MOTA, M. T. *et al.* Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. Future Virology, [s. l.], v. 10, n. 9, p. 1109–1122, set. 2015. Disponível em: <https://doi.org/10.2217/fvl.15.76>. Acesso em: 16 abr. 2022.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, S. F.; HADDOW, A. J. Zika virus isolations and serological specificity. Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene, [s. l.], v. 46, n. 5, p. 509-520, set. 1952. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/0035-9203\(52\)90042-4](https://doi.org/10.1016/0035-9203(52)90042-4). Acesso em: 16 abr. 2022.

DONADI, E. A. *et al.* Implications of the polymorphism of HLA-G on its function, regulation, evolution and disease association. Cellular and Molecular Life Sciences, Basel, v. 68, n. 3, p. 369-395, nov. 2011.

DUFFY, M. R. *et al.* Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. New England Journal of Medicine, Boston, v. 360, n. 24, p. 2536–2543, jun. 2009.

FERREIRA, M. L. B. *et al.* Guillain–Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: Detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 97, n. 5, p. 1405–1409, nov. 2017.

FERREIRA, M. L. B. *et al.* Neurological disease in adults with Zika and chikungunya virus infection in Northeast Brazil: a prospective observational study. The Lancet Neurology, London, v. 19, n. 10, p. 826-839, out. 2020.

FOX, J. M.; DIAMOND, M. S. Immune-mediated protection and pathogenesis of chikungunya virus. The Journal of Immunology, Rockville, v. 197, n. 11, p. 4210-4218, nov. 2016.

GIRARD, D.; BOIANI, N.; BEAULIEU, A. D. Human neutrophils express the interleukin-15 receptor α chain (IL-15R α) but not the IL-9R α component. Clinical immunology and immunopathology, New York, v. 88, n. 3, p. 232-240, set. 1998.

GORCHAKOV, R. *et al.* Optimizing PCR detection of zika virus from various body fluids. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 100, n. 2, p. 427–433, fev. 2019.

GOULD, E. A.; SOLOMON, T. Pathogenic flaviviruses. The Lancet, [s. l.], v. 371, n. 9611, p. 500-509, fev. 2008. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/S0140->

6736(08)60238-X. Acesso em: 16 abr. 2022.

GUERREIRO, R.; SANTOS-COSTA, Q.; AZEVEDO-PEREIRA, J. M. As quimiocinas e os seus receptores. Acta Medica Portuguesa, [s. l.], v. 24, [s.n.], p. 967-976, 2011. Disponível em:

<https://www.actamedicaportuguesa.com/revista/index.php/amp/article/view/1571/1155>. Acesso em: 16 abr. 2022.

GUO, C. *et al.* Global epidemiology of dengue outbreaks in 1990–2015: A systematic review and meta-analysis. Frontiers in Cellular and Infection Microbiology, [s.l.], v. 7, [s. n.], p. 1–11, jul. 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fcimb.2017.00317>. Acesso em: 16 abr. 2022.

GUZMÁN, M. G.; KOURÍ, G. Dengue diagnosis, advances and challenges. International Journal of Infectious Diseases, Hamilton, v. 8, n. 2, p. 69–80, mar. 2004.

HADDOW, A. D. *et al.* Genetic characterization of zika virus strains: Geographic expansion of the asian lineage. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1477-e1484, fev. 2012.

HASAN, S. Saif *et al.* Structural biology of Zika virus and other flaviviruses. Nature Structural and Molecular Biology, New York, v. 25, n. 1, p. 13–20, jan. 2018.

HERNANDEZ, R.; BROWN, D. T.; PAREDES, A. Structural Differences Observed in Arboviruses of the Alphavirus and Flavivirus Genera. Advances in Virology, [s.l.], v. 2014, [s.n.], p. 1-24, 2014. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/259382>. Acesso em: 16 abr. 2022.

HONÓRIO, N. A.; CÂMERA, D. C. P., CALVET, A. G. Chikungunya: uma arbovirose em estabelecimento e expansão no Brasil. Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro, v. 31, n. 5, p. 906–908, maio 2015.

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

JAVED, F. *et al.* Zika virus: what we need to know? Journal of Basic Microbiology, Berlin, v. 58, n. 1, p. 3–16, 13 nov. 2018.

KAM, Y. W. *et al.* Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. The Journal of Infectious Diseases, [s. l.], v. 216, n. 2, p. 172–181, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix261>. Acesso em: 16 abr. 2022.

KASHYAP, R. S. *et al.* Determination of toll-like receptor-induced cytokine profiles in the blood and cerebrospinal fluid of Chikungunya patients. NeuroImmunoModulation, Basel, v. 21, n. 6, p. 338–346, 2014.

KENNEDY, M. K. *et al.* Reversible defects in natural killer and memory CD8 T cell lineages in interleukin 15–deficient mice. Journal of Experimental Medicine, New York, v. 191, n. 5, p. 771-780, fev. 2000.

LAFON, M. *et al.* Modulation of HLA-G expression in human neural cells after neurotropic viral infections. Journal of Virology, Washington, v. 79, n. 24, p. 15226-15237, dez. 2005.

- LANDRY, M. L.; ST GEORGE, K. Laboratory diagnosis of zika virus infection. Archives of Pathology and Laboratory Medicine, Chicago, v. 141, n. 1, p. 60–67, out. 2016.
- LIBRATY, D. H. *et al.* High circulating levels of the dengue virus nonstructural protein NS1 early in dengue illness correlate with the development of dengue hemorrhagic fever. The Journal of Infectious Diseases, [s. l.], v. 186, n. 8, p. 1165–1168, out. 2002. Disponível em: <https://doi.org/10.1086/343813>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- LIN, H. H.; HUANG, L. M.; WU, S. C.. Zika virus molecular biology and perspectives for vaccine development: A review. Journal of Nursing Research, [s. l.], v. 25, n. 1, p. 3–6, fev. 2017. Disponível em: https://journals.lww.com/jnr-tna/Fulltext/2017/02000/Zika_Virus_Molecular_Biology_and_Perspectives_for.4.aspx. Acesso em: 16 abr. 2022.
- LUCENA-SILVA, N. *et al.* Encephalitis associated with inappropriate antidiuretic hormone secretion due to chikungunya infection in Recife, State of Pernambuco, Brazil. Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical, Brasília, v. 50, n. 3, p. 417-422, 2017.
- LUCENA-SILVA, N. *et al.* Haplotype frequencies based on eight polymorphic sites at the 3' untranslated region of the HLA-G gene in individuals from two different geographical regions of Brazil. Tissue antigens, Copenhagen, v. 79, n. 4, p. 272-278, jan. 2012.
- MARQUES, R. E. *et al.* Targeting CCL5 in inflammation. Expert Opinion on Therapeutic Targets, London, v. 17, n. 12, p. 1439-1460, out. 2013.
- MATHEUS, S. *et al.* Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika virus infection. Emerging Infectious Diseases. Atlanta, v. 22, n. 9, p. 1691–1693, set. 2016.
- MEHTA, R. *et al.* The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. Reviews in Medical Virology, Chichester, v. 28, n. 3, p. 1-24, abr. 2018.
- MEYDING-LAMADÉ, U.; CRAEMER, E.; SCHNITZLER, P. Emerging and re-emerging viruses affecting the nervous system. Neurological Research and Practice, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42466-019-0020-6>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- MRÓZEK, E.; ANDERSON, P.; CALIGIURI, M. A. Role of interleukin-15 in the development of human CD56+ natural killer cells from CD34+ hematopoietic progenitor cells, Blood, [s. l.], v. 87, n. 7, p. 2632-2640, abr. 1996. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0006497120647711?via%3Dihub>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V. M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. Clinical Microbiology and Infection, Oxford, v. 20, n. 10, p. O595–O596, out. 2014.
- MUSTAFÁ, Y. M. *et al.* Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. Frontiers in microbiology, [s. l.], v. 10, [s. n.], p. 1-14, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00525>. Acesso em: 16 abr. 2022.

- NAVECA, F. G. *et al.* Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 113, n. 6, p. 1–13, 2018.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Dengue epidemic in the state of Rio de Janeiro, Brazil, 1990-1: co-circulation of dengue 1 and dengue 2 serotypes. Epidemiology and Infection, Cambridge, v. 111, n. 1, p. 163-170, 1993.
- NOGUEIRA, R. M. R. *et al.* Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 83, n. 2, p. 219-225, jun. 1988.
- NUNES, P. C. G. *et al.* 30 years of fatal dengue cases in Brazil: a review. BMC Public Health, London, v. 19, n. 1, p. 1–11, 2019.
- OHST, C. *et al.* Reliable serological testing for the diagnosis of emerging infectious diseases. In: HILGENFELD, R.; VASUDEVAN, S. (Orgs.). Dengue and Zika: Control and Antiviral Treatment Strategies. Advances in Experimental Medicine and Biology, Springer, Singapore, vol 1062. p. 19-43, maio 2018. Disponível em: https://doi.org/10.1007/978-981-10-8727-1_3. Acesso em: 16 abr. 2022.
- ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE *et al.* Dengue: guidelines for diagnosis, treatment, prevention and control. Organização Mundial da Saúde, 2009.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Epidemiological Alert: Chikungunya Fever. Organização Pan-americana de Saúde, 2013.
- ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE. Number of reported cases of Chikungunya fever in the Americas, by country or territory cumulative cases epidemiological week/EW 52 (Updated 29 December 2014). Organização Pan-americana de Saúde, 2014.
- OSANAI, C. H. *et al.* Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report. Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, São Paulo, v. 25, p. 53-54, 1983.
- PALOMINO, D. C. T.; MARTI, L. C. Chemokines and immunity. Einstein, São Paulo, v. 13, n. 3, p. 469-473, 2015.
- PERERA, P. *et al.* The role of interleukin-15 in inflammation and immune responses to infection: implications for its therapeutic use. Microbes and infection, Paris, v. 14, n. 3, p. 247-261, mar. 2012.
- PIERSON, T. C.; DIAMOND, M. S. The emergence of Zika virus and its new clinical syndromes. Nature, London, v. 560, n. 7720, p. 573–581, ago. 2018.
- PRIYAMVADA, L. *et al.* Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America, Washington, v. 113, n. 28, p. 7852–7857, jul. 2016.
- SALLES, T. S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the American and Brazilian contexts: a review. Parasites & Vectors, London, v. 11, n. 264, p. 1–12, abr. 2018.
- SCHALL, Thomas J. *et al.* Selective attraction of monocytes and T lymphocytes of

the memory phenotype by cytokine RANTES. Nature, London, v. 347, n. 6294, p. 669-671, out. 1990.

SCHATZMAYR, H. G.; NOGUEIRA, R. M. R; TRAVASSOS DA ROSA, A. P. A. An Outbreak of Dengue virus at Rio de Janeiro-1986. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 85, p. 253, 1990.

SCHULER-FACCINI, L. *et al.* Possible Association Between Zika Virus Infection and Microcephaly-Brazil, 2015. Morbidity and Mortality Weekly Report, Atlanta, v. 65, n. 3, p. 1–4, 2016.

SCHWARTZ, O.; ALBERT, M. L. Biology and pathogenesis of chikungunya virus. Nature Reviews Microbiology, London, v. 8, n. 7, p. 491–500, jul. 2010.

SILVA, A. L. P. e; SPALDING, S. M. Virus Zika: epidemiologia e diagnóstico laboratorial. Revista Médica de Minas Gerais, Minas Gerais, v. 28, [S. N.], p. 1-5, set. 2018.

SILVA, M. N. *et al.* Vigilância de chikungunya no Brasil: desafios no contexto da Saúde Pública. Epidemiologia e Serviços de Saúde, Brasília, v. 27, n. 3, p. 1–10, set. 2018.

STEINHAGEN, K. *et al.* Serodiagnosis of Zika virus (ZIKV) infections by a novel NS1-based ELISA devoid of cross-reactivity with dengue virus antibodies: a multicohort study of assay performance, 2015 to 2016. Eurosurveillance, Saint-Maurice, v. 21, n. 50, p. 1–16, dez. 2016.

STYCZYNSKI, A. R. *et al.* Increased rates of Guillain-Barré syndrome associated with Zika virus outbreak in the Salvador metropolitan area, Brazil. PLoS Neglected Tropical Diseases, San Francisco, v. 11, n. 8, p. 1–13, ago. 2017.

TAPPE, D. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. Medical Microbiology and Immunology, Berlin, v. 205, n. 3, p. 269–273, dez. 2015.

TIAN, Y. *et al.* Dengue Virus and its inhibitors: a brief review. Chemical and Pharmaceutical Bulletin, Tokyo, v. 66, n. 3, p. 191–206, 2018.

VIEIRA, M. A. da C. e. S. *et al.* Potential role of dengue virus, chikungunya virus and zika virus in neurological diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 113, n. 11, p. 1–6, set. 2018.

WALDMANN, T. A.; TAGAYA, Y. The multifaceted regulation of interleukin-15 expression and the role of this cytokine in NK cell differentiation and host response to intracellular pathogens. Annual review of immunology, Palo Alto, v. 17, n. 1, p. 19-49, abr. 1999.

WHITEHEAD, S. S. *et al.* Prospects for a dengue virus vaccine. Nature Reviews Microbiology, London, v. 5, n. 7, p. 518–528, jul. 2007.

WILLISON, H. J.; JACOBS, B. C.; VAN DOORN, P. A. Guillain-Barré syndrome. The Lancet, [s. l.], v. 388, n. 10045, p. 717–727, ago. 2016. Disponível em: [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(16\)00339-1](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(16)00339-1). Acesso em: 16 abr. 2022.

YU, I-m. *et al.* Structure of the Immature Dengue Virus at Low pH Primes Proteolytic Maturation. Science. Washington, v. 319, n. 5871, p. 1834–1837, mar. 2008.

ZANLUCA, C.; DOS SANTOS, C. N. D. Zika virus: an overview. Microbes and Infection, Paris, v. 18, n. 5, p. 295–301, maio 2016.

APÊNDICE A – TERMOS DE CONSENTIMENTO E LIVRE ESCLARECIDO (TCLE)

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO PACIENTE:

Este termo de consentimento livre e esclarecido é documento integrante do projeto: *Complicações neurológicas pós-infecção por ZIKA (arbovirus): contribuição de moléculas/genes de histocompatibilidade, receptores leucocitários, citocinas e fatores pós-transcricionais.*

Registro CAAE:, no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva

Contato pesquisador responsável: (81) 2101-2618

O (A) Sr (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que envolverá pacientes que apresentaram manifestações neurológicas após apresentarem queixas relacionadas a infecção por vírus transmitidos por mosquitos (Zika, chikungunya, e Dengue) a partir de 18 anos, e seus comunicantes parentes e não parentes que moram no mesmo domicílio do paciente na época do início da sua doença, com o objetivo de identificar alguma característica genética ou substância no sangue dos pacientes que contribuíram para que ele e só ele tivesse a forma grave da doença, para isso a gente precisa comparar os genes ou substância presentes no sangue do paciente e presentes nas pessoas que moram na mesma casa que não tiveram a doença, ou tiveram a doença na sua forma leve, porque todos na mesma casa estão expostos ao mesmo mosquito que carregam o vírus, mas não desenvolveram a forma grave da doença, para responder o motivo dessa diferença nós precisamos que o (a) senhor (a) permita que nós possamos ter acesso ao registro hospitalar sobre a sua doença, e uma alíquota de sangue equivalente a 4mL (equivale a uma colher de sobremesa) em um tubo contendo substância conservante para podermos estudar sua característica genética, e comparar com quem não teve a forma grave da doença. Gostaríamos também de ter acesso a uma alíquota de 0,5mL do fluido da coluna retirado no hospital para o diagnóstico da infecção na coluna e armazenado, esse material é importante para identificar e comparar substâncias que estejam no sangue e que tenham passado para a coluna, e que possam estar contribuindo para o surgimento das suas queixas e que possam contribuir para identificar aqueles casos que tem uma recuperação mais rápida ou mais lenta. Para que possamos comprovar qual a substância possa estar contribuindo para o desenvolvimento dessas manifestações neurológicas, nós precisamos também de uma amostra de sangue após a sua recuperação e alta hospitalar.

Em relação aos possíveis riscos, desconfortos e benefícios para o (a) senhor (a), gostaríamos de mencionar que a coleta de amostra de sangue para pesquisa será feita durante a coleta de amostra para o diagnóstico realizado no hospital com material descartável que permite a coleta de várias amostras de sangue com apenas uma punção venosa (furada), esse procedimento pode trazer algum desconforto e extravasamento de sangue, que será minimizado por pressão após punção, e será feito pelo profissional de saúde do hospital durante o seu internamento, a coleta após a alta hospitalar será feita por profissional qualificado, com material descartável adquirido pela pesquisa. A coleta da urina será realizada apenas na fase aguda da doença em um volume de 15 mL e será usada para detecção de fragmentos do vírus com o objetivo de identificar o tipo de vírus e parte do vírus que pode ser responsável pela gravidade da doença (micro RNA). A coleta de fluido da coluna (fluido cefalorraquidiano) é realizada por profissional qualificado com o objetivo de diagnóstico no hospital, e caso o (a) senhor (a) concorde e assine essa autorização, quando disponível uma alíquota do fluido armazenada será encaminhada para a pesquisa. Devido ao tempo longo necessário para a pesquisa, pode ser que o (a) senhor (a) possa não usufruir diretamente dos resultados do estudo, mas esperamos identificar substâncias que possam ser utilizadas como marcadores de gravidade e de cura e que possam no futuro contribuir para desenvolvimento de métodos de diagnóstico, e descoberta de medicamentos que permitam uma recuperação mais rápida dos casos graves de infecção por esses vírus.

O (a) senhor (a) tem a liberdade de recusar ou retirar o seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa, sem nenhum prejuízo ou constrangimento. O (a) senhor (a) continuará sendo acompanhado pelo médico neurologista do hospital, independente da sua escolha. Qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa antes ou depois de sua conclusão estão garantidas através do seu médico, e do pesquisador responsável, cujo telefone de contato está acima, ainda que esta possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação.

Para sua participação voluntária é importante esclarecer que esta pesquisa não lhe trará qualquer custo; não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro, uma vez que sua participação na pesquisa não proporcionará nenhum gasto; o direito a indenização, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa, é conforme as leis vigentes no país, os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas e serão publicados em revistas científicas especializadas, no entanto, o (a) senhor (a) terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas.

A amostra de seu sangue, urina e do fluido da coluna será armazenado no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, é possível que outro pesquisador deseje utilizar sua amostra para pesquisa de outra natureza, visando desenvolver métodos de diagnóstico, estudar a genética e a imunidade da pessoa e as características biológicas do vírus, e que ficará armazenada em condições adequadas até acabar ou ser descartada por sua solicitação ou perda, por isso gostaríamos de saber se o (a) senhor (a) autoriza que sua amostra armazenada possa:

- Ser utilizada na realização de pesquisas de outra natureza **sem** sua autorização;
- Ser utilizada na realização de pesquisas de outra natureza **somente com** a sua autorização;

Após esses esclarecimentos, caso o (a) senhor (a) esteja de acordo, uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a).

Abaixo também seguem os dados de contato do pesquisador responsável, caso o(a) senhor (a) tenha alguma dúvida posteriormente ou deseje retirar seu consentimento. Para esclarecimentos de questões éticas, a senhora também pode entrar em contato com **o Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM-FIOCRUZ pelo telefone (81) 2101-2639 e com a pesquisadora Norma Lucena (81 2101-2618) do CPqAM/FIOCRUZ-PE.**

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Dados do participante (Indivíduos voluntários):

Nome legível:

Assinatura:

Data: _____

ENDEREÇO DAS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

CPqAM/FIOCRUZ-PE (Dra. Norma Lucena-Silva)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Av. Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife – PE. CEP 50.740-465.

HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO (Dra. Lúcia Brito, neurologist)

Avenida Agamenon Magalhães, S/N - Derby, Recife - PE, 12566-066, Telefone: (81) 3181-540

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO DO COMUNICANTE:

Este termo de consentimento livre e esclarecido é documento integrante do projeto: *Complicações neurológicas pós-infecção por ZIKA (arbovirus): contribuição de moléculas/genes de histocompatibilidade, receptores leucocitários, citocinas e fatores pós-transcricionais.*

Registro CAAE:, no Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, Fundação Oswaldo Cruz, Ministério da Saúde.

Pesquisador responsável: Profa. Dra. Norma Lucena Cavalcanti Licinio da Silva

Contato pesquisador responsável: (81) 2101-2618

O (A) Sr (a) está sendo convidado(a) a participar de um estudo que envolverá pacientes que apresentaram manifestações neurológicas após apresentarem queixas relacionadas a infecção por vírus transmitidos por mosquitos (Zika, chikungunya, e Dengue) a partir de 18 anos, e seus comunicantes parentes e não parentes que moram no mesmo domicílio do paciente na época do início da sua doença, com o objetivo de identificar alguma característica genética ou substância no sangue dos pacientes que contribuíram para que ele tivesse a forma grave da doença, para isso a gente precisa comparar os genes ou substância presentes no sangue do paciente com aqueles presentes nas pessoas que moram na mesma casa que não tiveram a doença, ou tiveram a doença na sua forma leve, porque todos estão expostos ao mesmo mosquito que carregam o vírus, mas não desenvolveram a forma grave da doença; para responder a razão dessa diferença nós precisamos que o (a) senhor (a) responda um questionário acerca da sua saúde na época que o (a) senhor (a) manteve contato com pacientes com manifestação neurológicas decorrentes de arbovirose, e uma alíquota de sangue equivalente a 4mL (equivale a uma colher de sobremesa) em um tubo contendo substância conservante fornecido pela pesquisa para podermos estudar sua característica genética, e comparar com quem não teve a forma grave da doença. A participação do (a) senhor (a) deve ser voluntária, não há nenhuma obrigação nessa participação, por isso é importante esclarecer alguns aspectos.

Em relação aos possíveis riscos, desconfortos e benefícios para o (a) senhor (a), gostaríamos de mencionar que a coleta de amostra de sangue para pesquisa será feita pelo profissional de saúde qualificado, com material descartável adquirido pela pesquisa, esse procedimento pode trazer algum incômodo e extravasamento de sangue, que será minimizado por pressão após punção. Devido ao tempo longo necessário para a pesquisa, pode ser que a pessoa de seu conhecimento com a doença viral com manifestação neurológica possa não usufruir diretamente dos resultados do estudo, mas esperamos identificar substâncias que possam ser utilizadas como marcadores de gravidade e de cura e que possam no futuro contribuir para desenvolvimento de métodos de diagnóstico, e descoberta de medicamentos que permitam uma recuperação mais rápida dos casos graves de infecção por esses vírus.

O (a) senhor (a) tem a liberdade de recusar ou retirar o seu consentimento em qualquer etapa da pesquisa, sem nenhum prejuízo ou constrangimento. Qualquer dúvida sobre os procedimentos, riscos e benefícios da pesquisa antes ou depois de sua conclusão estão garantidas pelo pesquisador responsável, cujo telefone de contato está acima, ainda que esta informação possa influenciar a sua vontade de continuar autorizando a sua participação.

Para sua participação voluntária é importante esclarecer que esta pesquisa não lhe trará qualquer custo; não haverá nenhuma forma de reembolso em dinheiro, uma vez que sua participação na pesquisa não proporcionará nenhum gasto; o direito a indenização, caso ocorra dano decorrente de participação na pesquisa, é conforme as leis vigentes no país; os resultados da pesquisa serão apresentados em reuniões científicas e serão publicados em revistas científicas especializadas, no entanto, o (a) senhor (a) terá garantida a segurança de que não será identificado e que será mantida a sua privacidade e o caráter confidencial das informações concedidas.

A amostra de seu sangue será armazenada no Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães, nesse aspecto é possível que outro pesquisador deseje utilizar sua amostra para pesquisa de outra natureza, com o objetivo de estudar as características genéticas e imunológicas mediante novos experimentos e metodologia, e que ficará armazenada em condições adequadas até acabar ou ser descartada por sua solicitação ou perda, por isso gostaríamos de saber se o (a) senhor (a) autoriza que sua amostra armazenada possa:

- Ser utilizada na realização de pesquisas de outra natureza **sem** sua autorização;
- Ser utilizada na realização de pesquisas de outra natureza **somente com** a sua autorização;

Após esses esclarecimentos, caso o (a) senhor (a) esteja de acordo, uma via deste documento, devidamente assinada será entregue ao senhor (a).

Abaixo também seguem os dados de contato da pesquisadora responsável, caso o(a) senhor (a) tenha alguma dúvida posteriormente ou deseje retirar o consentimento. Para esclarecimentos de questões éticas, a senhora também pode entrar em contato com **o Comitê de Ética em Pesquisa do CPqAM-FIOCRUZ pelo telefone (81) 2101-2639 e com a pesquisadores Norma Lucena (81 2101-2618) do CPqAM/FIOCRUZ-PE.**

Dados do pesquisador responsável:

Nome legível: Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva

Dados do participante (Indivíduos voluntários):

Nome legível:

Assinatura:

Data: _____

ENDEREÇO DAS INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:

CPqAM/FIOCRUZ-PE (Dra. Norma Lucena-Silva)

Centro de Pesquisas Aggeu Magalhães

Av. Professor Moraes Rego, s/n – Cidade Universitária, Recife – PE. CEP 50.740-465.

HOSPITAL DA RESTAURAÇÃO (Dra. Lúcia Brito, neurologist)

Avenida Agamenon Magalhães, S/N - Derby, Recife - PE, 12566-066, Telefone: (81) 3181-540

**APÊNDICE B – TABELA DE PROPORÇÃO DOS MEDIADORES SOLÚVEIS –
SGB**

Tabela 1 – Proporção dos mediadores solúveis – SGB

DIAGNÓSTICO NEUROLÓGICO	HLA-G	MIP-1 α	RANTES	IL-7	IL2R	IL-1 β	IFN- γ	IL-1 α	IL-5	IL-12	MIG	IL-6	VEGFA	IL-1RA	IL-10	INF- α	IL-9	TNF- α	IL-13	GMCSF	IL-4	IL-8
SGBflav/SGBchikv--Est-CHIKV	1,51	0,67	0,59	0,54	0,50	0,14	0,06	0,14	0,10	0,15	0,11	0,01	0,10	0,08	0,12	0,60	0,67	0,48	0,45	0,42	0,46	30,41
SGBchikv/SGBflav--Est-CHIKV	0,66	1,49	1,70	1,85	2,00	6,92	16,33	7,32	9,86	6,73	8,96	67,78	10,34	12,65	8,52	1,66	1,49	2,06	2,23	2,36	2,15	0,03
SGBflav/SGBambos--Est-CHIKV	4,31	0,31	0,96	0,44	0,42	0,03	0,01	0,06	0,01	0,02	0,02	0,04	0,19	0,14	0,25	0,09	0,08	0,05	0,03	0,02	0,07	15,04
SGBambos/SGBflav--Est-CHIKV	0,23	3,19	1,04	2,26	2,41	30,08	88,80	16,43	189,71	48,68	55,80	26,52	5,32	6,95	4,04	11,40	12,81	20,33	36,49	45,70	14,44	0,07
SGBchikv/SGBambos--Est-CHIKV	2,86	0,47	1,63	0,82	0,83	0,23	0,18	0,45	0,05	0,14	0,16	2,56	1,95	1,82	2,11	0,15	0,12	0,10	0,06	0,05	0,15	0,49
SGBambos/SGBchikv--Est-CHIKV	0,35	2,14	0,61	1,22	1,21	4,34	5,44	2,24	19,25	7,24	6,22	0,39	0,51	0,55	0,47	6,88	8,58	9,85	16,34	19,35	6,71	2,02
SGBflav/SGBchikv--Est-ZIKV	0,42	5,06	3,15	1,21	1,06	1,43	0,67	0,14	0,11	0,52	0,62	0,27	0,73	0,95	0,54	0,72	1,12	0,87	0,62	1,87	2,31	0,60
SGBchikv/SGBflav--Est-ZIKV	2,39	0,20	0,32	0,82	0,94	0,70	1,49	7,16	9,17	1,91	1,60	3,74	1,36	1,05	1,86	1,38	0,89	1,15	1,60	0,53	0,43	1,67
SGBflav/SGBambos--Est-ZIKV	1,39	1,39	2,00	0,12	0,10	0,06	0,05	0,07	0,07	0,45	0,48	0,20	1,09	0,55	0,38	0,58	0,38	0,55	0,35	0,75	0,48	0,40
SGBambos/SGBflav--Est-ZIKV	0,72	0,72	0,50	8,66	9,57	18,17	20,97	13,60	15,05	2,24	2,09	5,10	0,92	1,82	2,63	1,73	2,60	1,81	2,90	1,33	2,07	2,51
SGBchikv/SGBambos--Est-ZIKV	3,31	0,28	0,63	0,10	0,10	0,04	0,07	0,53	0,61	0,85	0,77	0,73	1,49	0,58	0,71	0,80	0,34	0,64	0,55	0,40	0,21	0,66
SGBambos/SGBchikv--Est-ZIKV	0,30	3,63	1,58	10,51	10,14	25,98	14,10	1,90	1,64	1,17	1,31	1,36	0,67	1,72	1,42	1,25	2,91	1,57	1,81	2,49	4,77	1,51
SGBflav/SGBchikv--Est-MOCK	18,88	4,95	10,30	1,96	1,06	1,97	1,17	0,80	1,38	0,68	1,29	0,57	0,81	1,47	1,00	1,17	1,67	1,37	1,18	1,49	3,45	0,89
SGBchikv/SGBflav--Est-MOCK	0,05	0,20	0,10	0,51	0,94	0,51	0,85	1,25	0,72	1,46	0,78	1,75	1,24	0,68	1,00	0,86	0,60	0,73	0,85	0,67	0,29	1,12
SGBflav/SGBambos--Est-MOCK	16,21	7,14	1,59	0,17	0,67	0,89	0,50	0,36	0,40	0,77	0,55	1,85	0,47	0,71	1,03	0,58	0,65	0,50	0,50	0,63	0,59	0,67
SGBambos/SGBflav--Est-MOCK	0,06	0,14	0,63	6,03	1,50	1,13	2,00	2,78	2,53	1,30	1,82	0,54	2,13	1,41	0,97	1,73	1,53	2,01	2,00	1,59	1,68	1,49
SGBchikv/SGBambos--Est-MOCK	0,86	1,44	0,15	0,08	0,63	0,45	0,43	0,45	0,29	1,12	0,43	3,25	0,58	0,48	1,03	0,50	0,39	0,36	0,42	0,42	0,17	0,75
SGBambos/SGBchikv--Est-MOCK	1,16	0,69	6,49	11,81	1,59	2,22	2,34	2,21	3,49	0,89	2,34	0,31	1,72	2,06	0,97	2,01	2,56	2,75	2,36	2,37	5,81	1,33

Fonte: O autor.

Legenda: Em negrito, os valores descritos no texto.

**APÊNDICE C – TABELA DE PROPORÇÃO DOS MEDIADORES SOLÚVEIS –
ENC**

Tabela 2 – Proporção dos mediadores solúveis – ENC

DIAGNÓSTICO NEUROLÓGICO	RANTES	IL-6	MCP-1	IL-8	INF- α	HGF	MIP-1 α	IL-13	IFN- γ	IL-17F	IL-1RA	FGF	MIP-1 β	IL-3	IL-15	IL-22	IL-2	GMCSF	TNF- α	IL-9	MIG	IL-2R	IL-1 β	IL-1 α
ENCchikv/ENCambos--Est-CHIKV	0,00	0,01	0,01	0,04	1,15	0,43	0,45	0,37	0,04	0,01	0,01	0,09	0,14	0,30	37,65	11,98	36,08	2,84	0,63	0,49	0,42	4,70	4,25	0,96
ENCambos/ENCchikv--Est-CHIKV	1822,43	119,43	188,42	26,97	0,87	2,31	2,23	2,69	27,13	123,38	89,81	11,41	7,34	3,35	0,03	0,08	0,03	0,35	1,58	2,04	2,37	0,21	0,24	1,05
ENCchikv/ENCambos--Est-ZIKV	0,00	0,00	0,02	0,16	0,15	0,05	0,11	0,13	1,29	0,46	1,07	1,10	0,68	1,46	47,20	1,15	1,49	10,06	41,80	8,82	10,58	13,88	8,28	9,83
ENCambos/ENCchikv--Est-ZIKV	1024,48	332,84	44,86	6,11	6,64	21,83	9,36	7,97	0,78	2,16	0,94	0,91	1,47	0,68	0,02	0,87	0,67	0,10	0,02	0,11	0,09	0,07	0,12	0,10
ENCchikv/ENCambos--Est-MOCK	0,02	0,06	0,45	1,41	0,02	0,13	0,65	3,83	0,73	0,04	1,34	1,64	0,49	34,93	49,61	0,06	1,97	0,95	1,12	1,62	1,42	1,82	0,14	0,08
ENCambos/ENCchikv--Est-MOCK	50,47	17,55	2,22	0,71	52,92	7,42	1,54	0,26	1,37	27,99	0,75	0,61	2,05	0,03	0,02	17,70	0,51	1,05	0,89	0,62	0,71	0,55	7,11	12,93

Fonte: O autor.

Legenda: Em negrito, os valores descritos no texto.

APÊNDICE D – ARTIGO

PERFIL DA RESPOSTA IMUNOLÓGICA DE MEMÓRIA EM PACIENTES COM HISTÓRICO DE NEUROARBOVIROSE E SEU COMUNICANTE INTRADOMICILIAR, NÃO GENETICAMENTE RELACIONADO, FRENTE AO DESAFIO COM ANTÍGENOS DE ARBOVÍRUS (DENV, ZIKV E CHIKV)

Mauro César da Silva¹, Renata Santos Almeida¹, Paulin Sonon¹, Marli Tenório Cordeiro⁴, Ibrahim Sadissou³, Maria de Fátima Pessoa Militão-Albuquerque⁵, Eduardo Antônio Donadi⁶, Norma Lucena-Silva¹

1 Laboratório de Imunogenética, Departamento de Imunologia, Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife PE, Brasil

2 Hospital da Restauração Governador Paulo Guerra, Recife PE, Brasil

3 Universidade de Medicina de Ribeirão Preto, Departamento de Imunologia, Ribeirão Preto, SP, Brasil

4 Departamento de Virologia e Terapia Experimental, Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife PE, Brasil

5 Departamento de Saúde Coletiva, Instituto Aggeu Magalhães-Fiocruz, Recife PE, Brasil

RESUMO

Os mosquitos do gênero *Aedes* são responsáveis pela cocirculação dos vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV) e chikungunya (CHIKV). Esses arbovírus, quando sintomáticos, podem promover nos indivíduos infectados um amplo espectro de síndromes clínicas, incluindo doenças neuroinvasivas, como a encefalite e a síndrome de Guillain-Barré (SGB). O mecanismo de patogênese das neuroarboviroses é complexo e ainda não foi completamente esclarecido o papel dos mediadores solúveis na patogênese da doença. Diante disso, tivemos como objetivo compreender a resposta imunológica de memória nas células mononucleares do sangue periférico de pacientes com histórico de neuroarbovirose e seu comunicante intradomiciliar (cônjuge), frente ao desafio com antígenos de arbovírus. A população de estudo foi composta por 16 pacientes maiores de 18 anos, que tiveram diagnóstico clínico e laboratorial de neuroarbovirose (6 de encefalite e 10 de SGB) atendidos no Setor de Neurologia do Hospital da Restauração (HR), Recife, Pernambuco e seu respectivo cônjuge. As PBMCs dos pacientes e comunicantes foram cultivadas e desafiadas com os antígenos de DENV, CHIKV e ZIKV; os mediadores solúveis foram quantificados com o kit Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel; e um ELISA do tipo sanduíche foi realizado para mensurar os níveis de HLA-G solúvel. Observamos que o perfil de expressão dos mediadores solúveis da resposta imunológica varia de acordo com o agente infeccioso, que influencia na apresentação clínica da doença; onde os antígenos de CHIKV apresentaram uma maior antigenicidade. Além disso, também foi constatado que a encefalite está associada a expressão exacerbada dos mediadores solúveis, possivelmente devido a fatores genéticos que tornam esses indivíduos extremamente responsivos a antígenos e a uma menor eficiência na resposta antiviral, que foi comprovada no sobrenadante de PBMCs dos comunicantes que apresentaram aumento de IL-15 em relação as PBMCs dos pacientes com histórico de encefalite.

Palavras-chave: resposta imunológica; neuroarbovirose; estudo in vitro; Dengue; Zika; chikungunya.

ABSTRACT

Mosquitoes of the *Aedes* genus are responsible for the cocirculation of dengue (DENV), Zika (ZIKV) and chikungunya (CHIKV) viruses. These arboviruses, when symptomatic, can promote a wide spectrum of clinical syndromes in infected individuals, including neuroinvasive diseases such as encephalitis and Guillain-Barré syndrome (GBS). The mechanism of pathogenesis of neuroarboviruses is complex and the role of soluble mediators in the pathogenesis of the disease has not been completely clarified. Therefore, we aimed to understand the memory immune response in peripheral blood mononuclear cells of patients with a history of neuroarbovirosis and their household contact (spouse), facing the challenge with arbovirus antigens. The study population consisted of 16 patients over 18 years of age, who had a clinical and laboratory diagnosis of neuroarbovirus (6 encephalitis and 10 GBS) treated at the Neurology Sector of Hospital da Restauração (HR), Recife, Pernambuco and its respective spouse. PBMCs from patients and contacts were cultured and challenged with DENV, CHIKV and ZIKV antigens; soluble mediators were quantified with the Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel kit; and a sandwich-type ELISA was performed to measure soluble HLA-G levels. We observed that the expression profile of soluble immune response mediators varies according to the infectious agent, which influences the clinical presentation of the disease, where CHIKV antigens showed greater antigenicity. In addition, encephalitis was also found to be associated with exacerbated expression of soluble mediators, possibly due to genetic factors that make these individuals extremely responsive to antigens and to a lower efficiency in the antiviral response, which was proven in the PBMC supernatant of contacts that showed an increase in IL-15 compared to the PBMCs of patients with a history of encephalitis.

Keywords: immune response; neuroarbovirus; in vitro study; Dengue; Zika; chikungunya.

INTRODUÇÃO

As arboviroses, causadas pelos arbovírus (do inglês – *Arthropod-borne virus*) transmitidas por espécies de mosquito do gênero *Aedes*, particularmente o *Aedes aegypti* e o *Aedes albopictus*, têm se caracterizado como um dos principais problemas de saúde pública no mundo. Nas Américas, esses vetores são responsáveis pela cocirculação dos vírus da dengue (DENV), Zika (ZIKV), chikungunya (CHIKV), e da febre amarela, apresentando um extenso histórico desafiador para a assistência e vigilância da saúde populacional (BRASIL, 2019; SALLES et al., 2018).

As arboviroses são caracterizadas por um amplo espectro de síndromes clínicas, desde doenças febris leves a graves, até febre hemorrágica e ainda doenças neuroinvasivas; estas podem levar a resultados fatais, ou deixar sequelas a longo prazo. Diversas manifestações neurológicas graves têm surgido no Brasil, após a infecção pelos arbovírus DENV, ZIKV e CHIKV, intensificando-se nos períodos de surtos sazonais e acometendo o sistema nervoso central e periférico. A

encefalite e a Síndrome de Guillain-Barré (SGB) são as manifestações de neuroarboviroses mais frequentes e apesar dos processos de patogenia das arboviroses serem bem conhecidos; os mecanismos patogênicos que levam ao comprometimento neurológico seguem amplamente desconhecidos, mas em processo de desenvolvimento teórico-experimental (ALMEIDA et al., 2021; CERNY et al., 2017; MEYDING-LAMADÉ, CRAEMER, SCHNITZLER, 2019; MUSTAFÁ et al., 2019; VIEIRA et al., 2018).

Estes arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) podem acessar o sistema neurológico por algumas vias, a maioria delas envolvendo a barreira hematoencefálica (BHE) com a produção elevada de mediadores inflamatórios como IL-6, VEGF, TNF- α , IFN- γ , IL-1 β e IL-10, MCP-1, que aumentam a permeabilidade da barreira e viabilizam maior dano no parênquima cerebral. Há ainda a possibilidade de os vírus infectarem axônios, promovendo então o transporte axonal retrógrado que viabiliza a entrada no parênquima cerebral (MEYDING-LAMADÉ, CRAEMER, SCHNITZLER, 2019; MUSTAFÁ et al. 2019).

A grande problemática das neuroarboviroses é que ainda não se tem clareza a respeito dos possíveis mecanismos subjacentes que levam ao seu desenvolvimento. A febre e a mialgia são os únicos achados clínicos sugestivos para infecção arboviral associados ao diagnóstico laboratorial de DENV, ZIKV e CHIKV nos pacientes com manifestações neurológicas (até o momento não se tem conhecimento sobre a possibilidade de infecções assintomáticas causarem comprometimento neurológico) e em muitos dos casos os sinais neurológicos começam após um período livre de sintomas de 1-3 semanas, apontando para um processo autoimune. Além disso, existem outros vírus neurotrópicos com uma extensa sobreposição com as manifestações clínicas arbovirais clássicas, e apesar da disponibilidade de ferramentas avançadas de diagnóstico microbiológico, o diagnóstico etiológico é alcançado em menos de 50% dos casos de supostas infecções virais do sistema nervoso central (SNC) (CAGLIOTI et al., 2013; CERNY et al., 2017; MEHTA et al., 2018; VIEIRA et al., 2018).

Apesar de pouco definido, já se sabe que a resposta imunológica contribui de forma expressiva no processo de patogênese das neuroarboviroses. No entanto, o papel desses mediadores solúveis na patogênese das manifestações neurológicas secundárias a arbovirose ainda não foi esclarecido, bem como a influência genética no desenvolvimento dessas formas graves entre indivíduos com mesmo grau de

exposição ao agente infeccioso e diferente espectro da doença. Neste estudo fizemos uso das células mononucleares do sangue periférico (PBMCs) de pacientes que tiveram neuro arbovirose e seu cônjuge a fim de, através do estímulo com antígenos de arbovírus *in vitro*, estudarmos a expressão diferencial dessas moléculas solúveis que são estimuladas pelos antígenos. Para assim entender como as moléculas solúveis: citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento, interagem entre si, modificando a resposta imunológica dos arbovírus e influenciando na permeabilidade da barreira hematoencefálica, contribuindo para o quadro neurológico das arboviroses.

MATERIAS E MÉTODOS

A seguir, estão dispostas as informações metodológicas deste trabalho.

Considerações éticas

Este subprojeto é um desdobramento do trabalho intitulado “*Manifestações neurológicas associados a infecção por Zika vírus*” que foi aprovado pelo CEP da FIOCRUZ-PE, sobre o registro CAAE:51106115.8.0000.5190, seguindo a recomendação da legislação brasileira de pesquisa com seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde.

Tipo, local de estudo e coleta de amostra

O estudo é experimental observacional, cujos casos estudados foram selecionados dentre os pacientes com mais de 18 anos diagnosticados clinicamente e em laboratório com infecção por arbovírus manifestados neurologicamente. Esses pacientes foram atendidos pelos profissionais do Setor de Neurologia do Hospital da Restauração (HR), em Recife; e, após a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), foram devidamente cadastrados no projeto. Também foram selecionados, para cada paciente com caso neurológico após a infecção por arbovirose, um comunicante que manteve contato próximo. De preferência, esses comunicantes deveriam ser intradomiciliares, não relacionados geneticamente, sem história de arboviroses; ou, alternativamente, com história de arboviroses, mas sem manifestação neurológica.

Para estudo do perfil inflamatório, juntamente com o HLA-G, foram comparados os níveis de 36 mediadores solúveis expressos no sobrenadante das diferentes culturas de PBMCs de pacientes acometidos neurologicamente, em paralelo a seus comunicantes intradomiciliares. O número amostral foi reduzido, composto por 16 pacientes e seus respectivos comunicantes, devido ao custo do ensaio e à grande geração de dados. Assim sendo, foram priorizadas as análises dos pares não relacionados geneticamente, expostos, sem infecção viral.

Os mediadores solúveis da inflamação foram expressos pelas PBMCs mediante o desafio com antígenos inativos dos arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV), produzidos no Laboratório de Virologia e Terapia Experimental (LAVITE - Fiocruz Pernambuco). Após oito dias de cultivo em células VeroE6, os sobrenadantes das culturas foram coletados e purificados; posteriormente o material infeccioso teve sua atividade medida por meio de um MAC-ELISA. A inativação foi realizada adicionando BPL a 0,025% por 24 horas à 4°C com *shaking* intermitente. O material infeccioso tratado teve uma atividade avaliada em outras etapas através do MAC-ELISA, e atendendo aos critérios estabelecidos, esse material foi concentrado e uma vez confirmado a sua inativação, seguiu para a liofilização, sendo posteriormente utilizado como antígeno em ensaios sorológicos. O antígeno normal (MOCK), na ausência do vírus, foi utilizado como controle e o preparo se dá como supracitado.

Cultura de células PBMCs para estímulo

Para o isolamento das PBMCs, foram coletados três tubos com sangue (15 mL) de cada paciente, tendo a heparina como anticoagulante. Em dois tubos cônicos de 15 mL, as células sanguíneas foram fracionadas por gradiente de densidade, mediante a adição de cerca de 7 mL de sangue sobre 4 mL de Ficoll-Paque. Os tubos cônicos foram então submetidos a centrifugação a 2000 RPM, por 30 minutos, com uma aceleração de 7 e frenagem de 5. Após a centrifugação, foi feita a remoção do plasma sanguíneo seguida da sua inclusão em tubos criogênicos, sem que houvesse mistura entre os materiais dos dois tubos. Na sequência, foram armazenados a fim de servirem de amostras para estudos futuros. O anel de leucócitos formado ao final da centrifugação foi transferido para outro tubo cônico de 15 mL e o volume foi preenchido com meio RPMI incompleto, com o objetivo de lavar as células para evitar um maior estresse celular no meio de cultura. Esse tubo de lavagem foi submetido à centrifugação a 1600 RPM, por 6 minutos, com

aceleração de 9 e frenagem de 7. Feito isso, o sobrenadante foi desprezado e 2 mL de meio RPMI completo (20% de soro bovino fetal) foram adicionados para ressuspender o *pellet* formado. Na intenção de determinar o número de células por mL de suspensão, a contagem das células foi realizada e, para isso, foram adicionados 95 µL de Trypan Blue e 5 µL de amostra. Com isso, a homogeneização foi realizada e, em seguida, 10 µL da mistura foram pipetados e adicionados na Câmara de Neubauer para visualização em microscópio óptico; nessa etapa, uma contagem igual ou próxima ao valor de 12×10^6 em 2.400 µL (200 µL para cada poço da placa = 1×10^6 células) foi a considerada ideal para cultivo.

As células foram estimuladas com os antígenos Mock, DENV, CHIKV e ZIKV na diluição de 1:20 e, em cada poço da placa, foram adicionados 200 µL alcançando então a concentração final de 1:40; isso se deu devido aos 200 µL de suspensão de células. Cada estímulo foi realizado em duplicata para as PBMCs de cada indivíduo, inclusive o controle negativo, que era composto pela suspensão de células e adição de 200 µL de meio RPMI completo. No estímulo PHA (fitohemaglutinina, do inglês: *phytohaemagglutinin*), a concentração diferiu, pois adquiriu-se comercialmente esse antígeno na concentração de 1.510 µg/mL; preparou-se então uma solução na concentração de 2,5 µg/mL e distribuiu-se 200 µL em cada poço, alcançando a concentração de 1,25 µg/mL. Na montagem da placa, primeiro foram adicionados os estímulos e, em seguida, a suspensão das células; a placa montada (Tabela 1) foi incubada em estufa de CO₂ a 37°C, por 36 horas (+/- 6 horas). Finalizado o período de incubação, os sobrenadantes foram coletados e armazenados a -80°C, para avaliação posterior dos mediadores solúveis.

Níveis de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento

Para a determinação quantitativa dos níveis de citocinas, receptores de citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento foi utilizado o kit Human Cytokine Magnetic 35-Plex Panel (Invitrogen, Carlsbad, Estados Unidos da América), conforme instruções do fabricante.

Níveis de HLA-G solúvel (HLA-Gs)

Os níveis de HLA-Gs (isoformas HLA-G1 e HLA-G5) foram mensurados, no plasma dos pacientes e seus comunicantes, por meio de ELISA do tipo sanduíche, conforme descrito por Martelli-Palomino et. al. (2013). As densidades ópticas serão

medidas a 450 nm. Todas as amostras foram analisadas em duplicata e os níveis de HLA-Gs total foram determinados por meio de uma curva padrão com cinco pontos, utilizando diluições de HLA-G5 calibrado como reagente. Os resultados serão expressos em ng/mL.

Análise Estatística

Os níveis dos mediadores solúveis, incluindo o HLA-G, foram analisados através da média e mediana com o software SPSS (versão 20 (SAS Institute, Cary, NC)) e GraphPad Prism (versão 5.01 (GraphPad Software, Inc.)), sendo o P -valor $\leq 0,05$, considerado significativo. Os dados clínicos foram avaliados por meio de análise descritiva. Para averiguar se os dados obtidos seguiam a distribuição Gaussiana, foram utilizados os testes de normalidade de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. Nas análises de amostras relacionadas, utilizou-se Wilcoxon; para as análises paramétricas utilizou-se Levene mais teste t ; enquanto que, para as análises não-paramétricas, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis foram empregados. As correlações entre os 36 mediadores solúveis foram avaliadas por meio do Coeficiente de Correlação de Spearman, e apenas $Rho > 0.9$ e $P < 0,01$ foram considerados.

RESULTADOS

A seguir, estão apresentados os resultados alcançados neste estudo.

Perfil da população de estudo

O estudo foi composto por 16 pacientes atendidos no Setor de Neurologia do HR, em Recife, entre 2015 e 2016, com diagnóstico clínico e laboratorial de infecção por arbovírus, seguida por complicações neurológicas. Seis pacientes foram confirmados como portadores de encefalite e dez como portadores de síndrome de Guillain-Barré secundária à arbovirose. A imunidade de memória desses pacientes foi avaliada comparando os níveis de vários mediadores solúveis liberados no sobrenadante de cultura de PBMCs estimulados com MOCK, PHA, CHIKV, DENV e ZIKV. Em conjunto, alguns mediadores solúveis, IL-10 ($P = 0,023$), IL-12 ($P = 0,015$), VEGFA ($P = 0,009$) e IFN- α ($P = 0,035$) apresentaram-se aumentados na presença dos estímulos com DENV, CHIKV e ZIKV em relação à cultura sem estímulo. Além

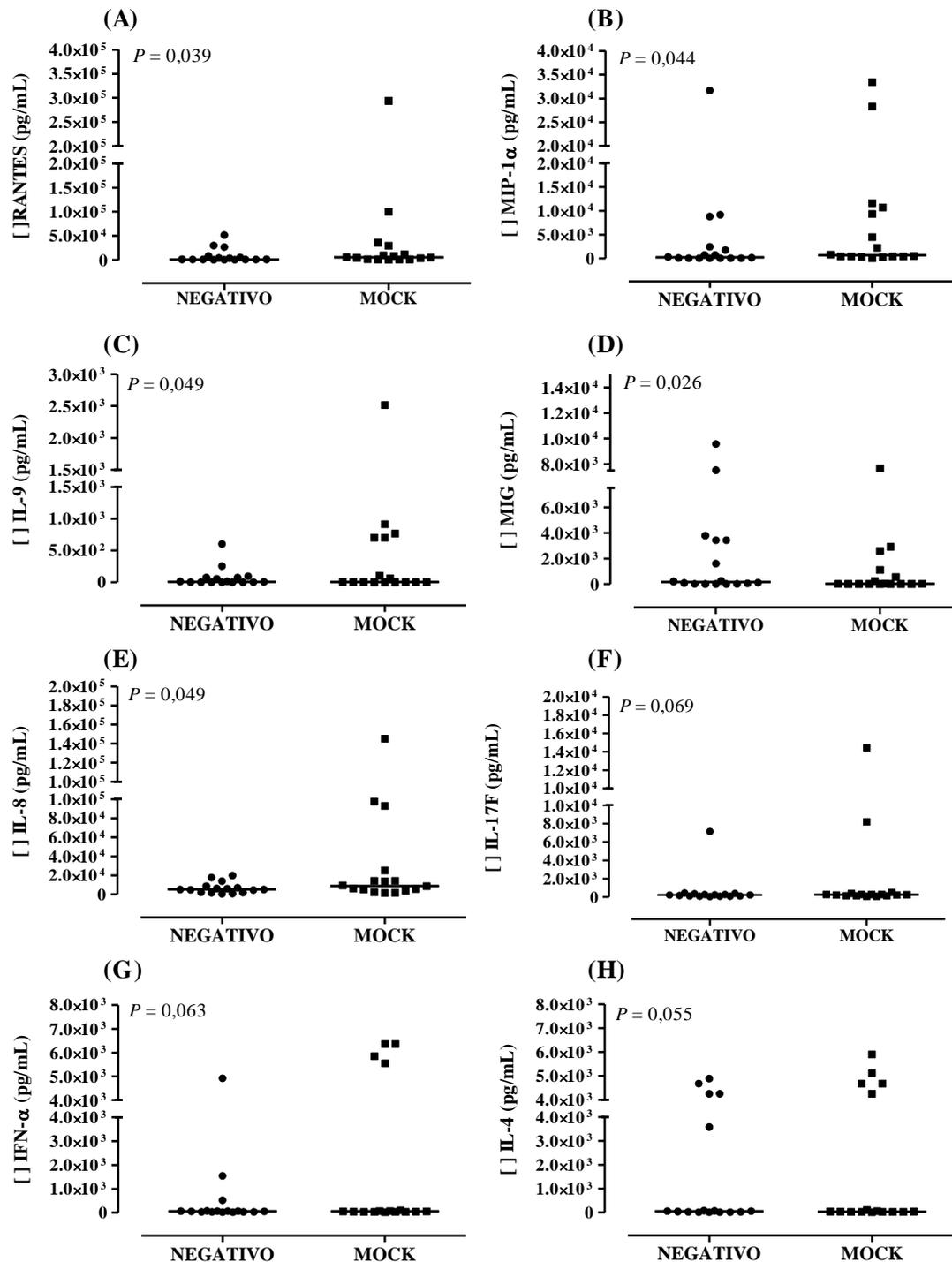
desses, os mediadores MIG ($P = 0,053$) e IL-1 α ($P = 0,078$) também apresentaram níveis elevados, porém sem atingir a significância estatística.

Esses resultados foram observacionais e apenas demonstraram o aumento significativo desses mediadores, mas sem relação com a apresentação clínica da doença.

Influência do antígeno normal (MOCK) sobre o perfil de expressão dos mediadores

Considerando que antígenos virais utilizados no estudo de desafio (DENV, ZIKV e CHIKV) foram obtidos no sobrenadante da cultura dos respectivos vírus em células VeroE6 (linhagem celular derivada do rim do macaco verde africano), após a inativação viral, purificação e concentração biofísica, nós utilizamos como controle negativo o sobrenadante das células VeroE6 não infectadas (MOCK) submetidas aos mesmos processos da cultura infectada para avaliar a existência de uma resposta imunológica inespecífica aos antígenos de células VeroE6. Para tanto, comparou-se a expressão dos mediadores solúveis produzidos pela cultura de PBMC sem estímulo (NEG) ($n = 16$) com os resultados obtidos a partir da cultura na presença do MOCK ($n = 16$). Diferenças significativas foram observadas nos níveis de RANTES ($P = 0,039$), MIP-1 α ($P = 0,044$), IL-9 ($P = 0,049$), MIG ($P = 0,026$) e IL-8 ($P = 0,049$) (Figura 1A-D).

Além desses resultados, houve tendência estatística à significância em relação a IL-17F ($P = 0,069$), IFN- α ($P = 0,063$) e IL-4 ($P = 0,055$) (Figura 1E-H). Como os PBMCs responderam de forma inespecífica ao antígeno MOCK, todas as subsequentes análises de expressão dos mediadores aos estímulos virais foram comparadas com a expressão induzida pelos antígenos MOCK, e não mais com a cultura sem estímulo (NEG).

Figura 1 – Resposta imunológica inespecífica de PBMC aos antígenos MOCK

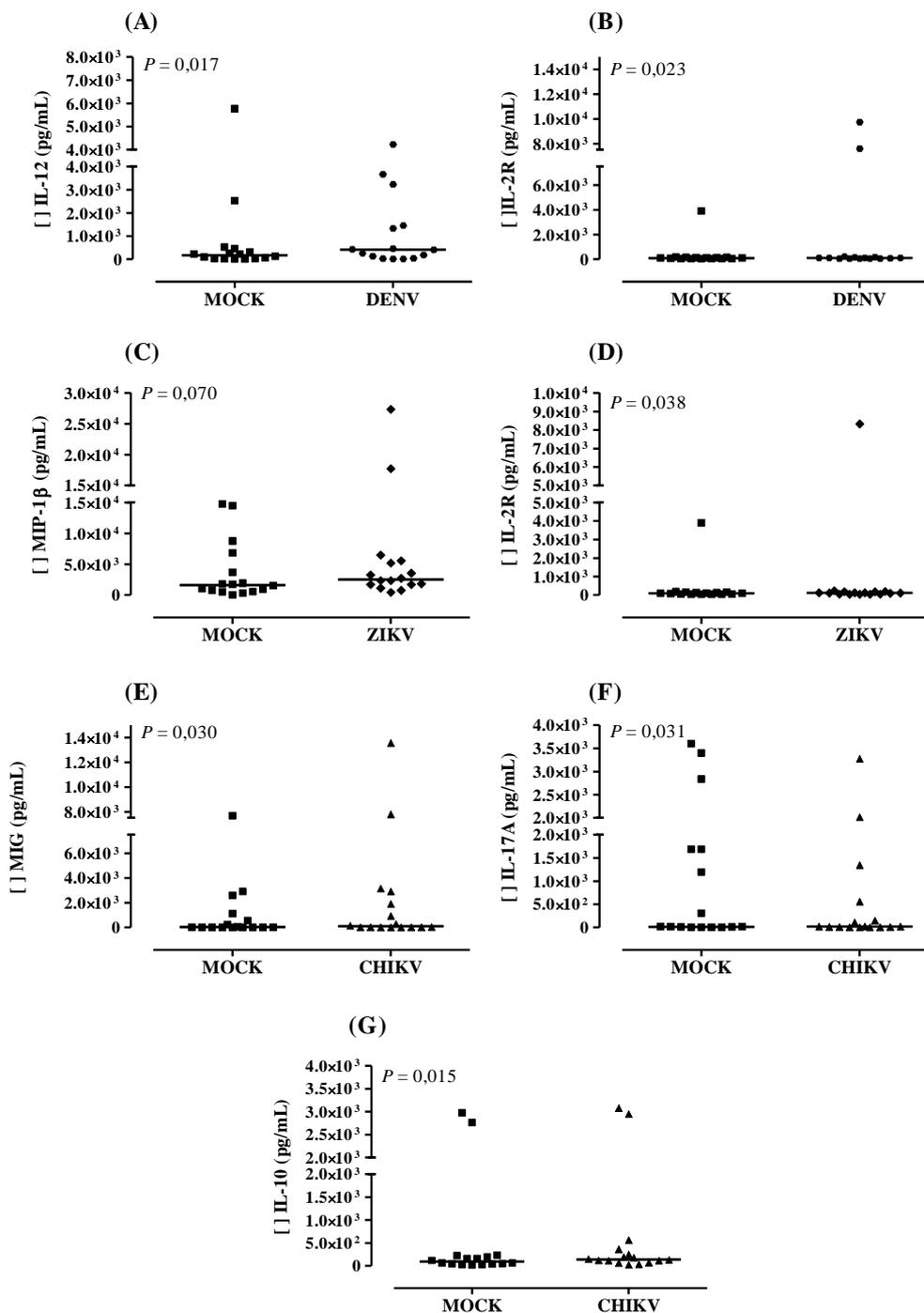
Fonte: O autor.

Legenda: (A-E) Mediadores solúveis com diferença estatística significativa (aumentados) em relação ao estímulo de MOCK. (F-H) Mediadores solúveis que demonstraram tendência à diferença estatística. NEGATIVO (n = 16) e MOCK (n = 16). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Wilcoxon.

Resposta imunológica de memória de pacientes com histórico de neuroarbovirose a antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV)

O perfil da resposta imunológica de memória foi avaliado considerando os estímulos virais individualmente (DENV, ZIKV e CHIKV) ($n = 16$), em relação ao estímulo MOCK ($n = 16$). Como resultado, verificou-se que os diferentes estímulos virais mostraram diferenças na expressão dos mediadores solúveis, conforme descrito: a resposta de memória aos antígenos DENV foi caracterizada pelo aumento de IL-12 ($P = 0,017$) e IL-2R ($P = 0,023$) (Figura 2A-B); a resposta mediada pelo ZIKV foi caracterizada pelo aumento de IL-2R ($P = 0,038$) e MIP-1 β ($P = 0,070$), com este último não atingindo a significância estatística (Figura 2C-D); e a resposta de memória aos antígenos de CHIKV foi caracterizada pelo aumento de IL-10 ($P = 0,015$), IL-17A ($P = 0,031$) e MIG ($P = 0,030$) (Figura 2E-G).

Figura 2 – Resposta imunológica de memória em cultura de células mononucleares de pacientes com histórico de neuroarbovirose desafiadas com antígenos dos arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV)



Fonte: O autor.

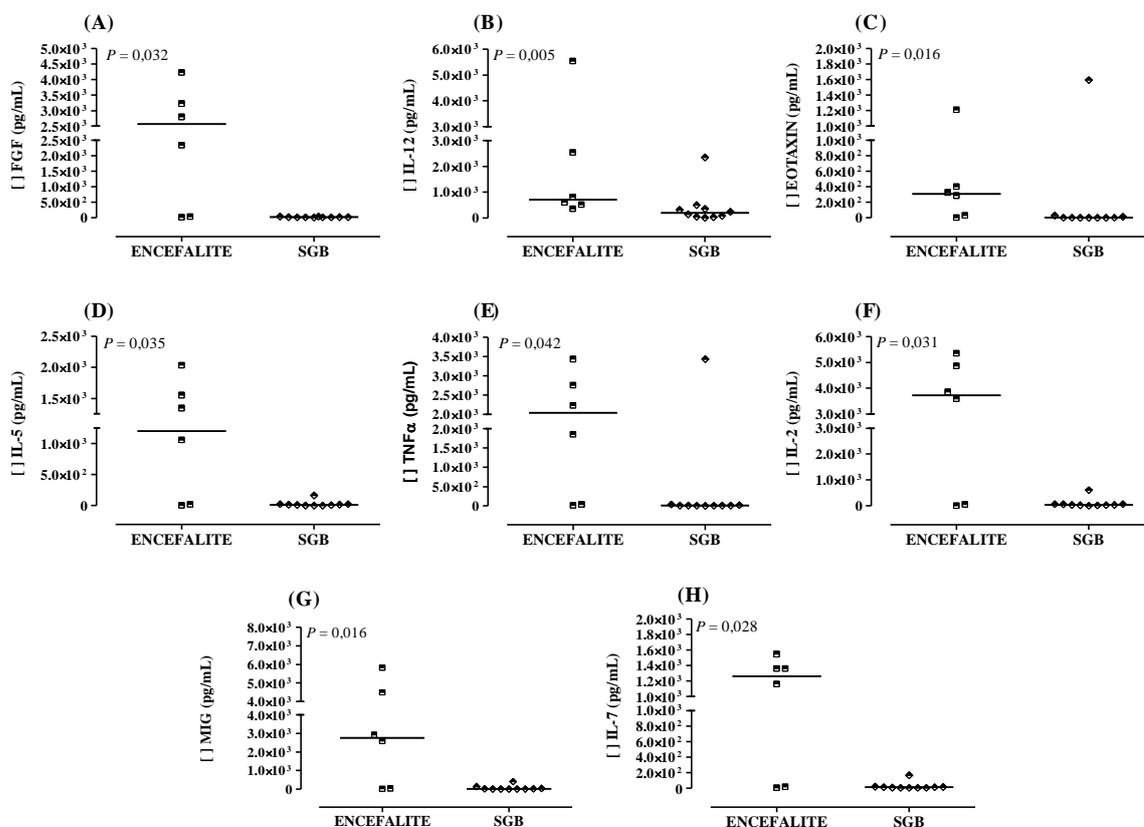
Legenda: (A-B) Mediadores solúveis diferencialmente expressos (aumentados) em relação à DENV. (C-D) Mediadores solúveis diferencialmente expressos e com tendência estatística, em relação à em relação à ZIKV. (E-G) Mediadores solúveis diferencialmente expressos em relação à CHIKV. MOCK, DENV, CHIKV e ZIKV (n = 16, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Wilcoxon.

Perfil imunológico de memória de pacientes de acordo com a síndrome neurológica secundária a arbovirose

A diferença da resposta de memória de pacientes com histórico de acometimento do sistema nervoso central (encefalite, $n = 6$) e do periférico (Síndrome Guillain-Barré, $n=10$), secundários à arbovirose, foi analisada comparando-se os níveis de mediadores em sobrenadante de cultura de células mononucleares de pacientes, frente ao desafio com antígenos de arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV).

Na presença de antígenos DENV, as células dos pacientes com histórico de encefalite apresentaram um aumento dos níveis de IL-15 ($P = 0,075$) e IL-2 ($P = 0,078$), quando comparados à SGB, porém essa diferença não foi estatisticamente significativa. Entretanto, o estímulo com antígeno de ZIKV mostrou um aumento significativo nos níveis de IL-12 ($P = 0,005$), EOTAXIN ($P = 0,016$), MIG ($P = 0,016$), IL-7 ($P = 0,028$), IL-2 ($P = 0,031$), FGF ($P = 0,032$), IL-5 ($P = 0,035$), TNF- α ($P = 0,042$) (Figura 3A-H). Além desses, o IL-4 ($P = 0,066$) mostrou uma tendência à significância estatística.

Figura 3 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando apenas o histórico de neuroarbovirose sob estímulo de ZIKV

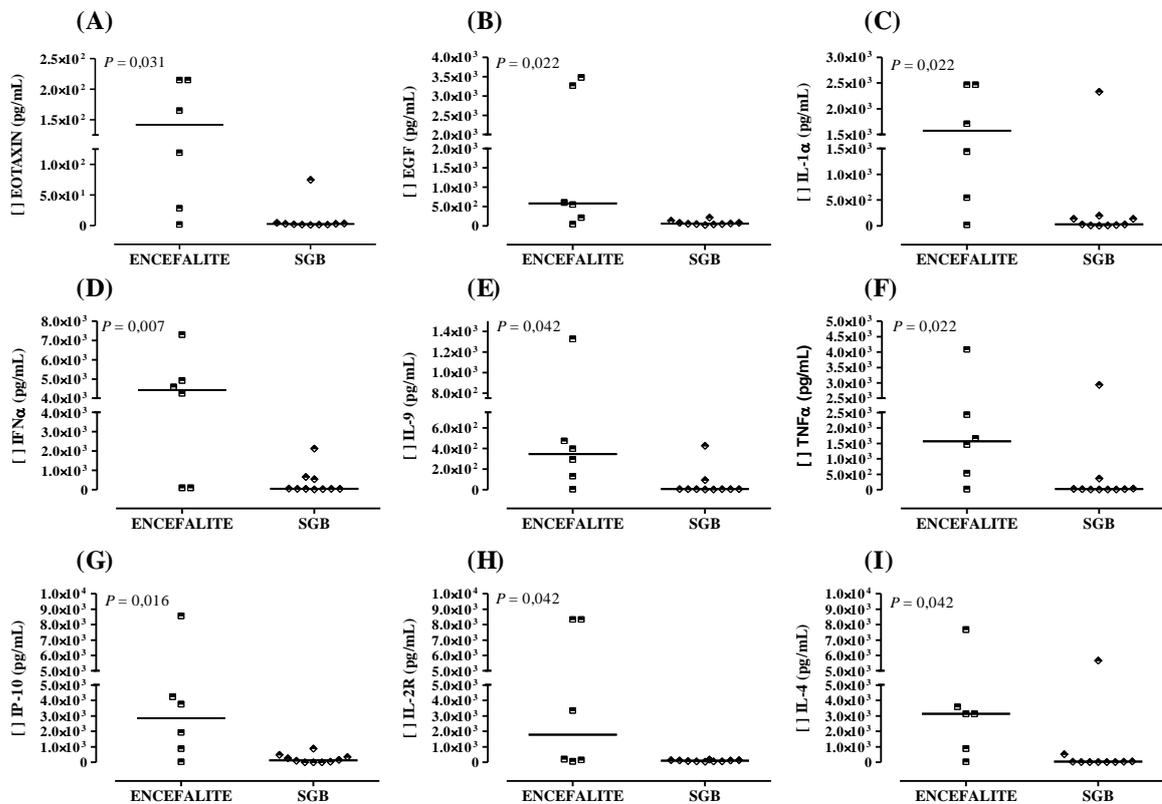


Fonte: O autor.

Legenda: (A-H) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de ZIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite. ENCEFALITE (n = 6) e SGB (n = 10). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Mann-Whitney para os casos não paramétricos e Levene+Teste t (considerando igualdade de variâncias assumidas ou não) para testes paramétricos.

As células mononucleares dos pacientes com histórico de encefalite também responderam ao estímulo com CHIKV aumentando os níveis IFN- α ($P = 0,007$), IP-10 ($P = 0,016$), IL-1 α ($P = 0,022$), TNF- α ($P = 0,022$), EGF ($P = 0,022$), EOTAXIN ($P = 0,031$), IL-2R ($P = 0,042$), IL-9 ($P = 0,042$), IL-4 ($P = 0,042$) (Figura 4A-I). Além desses, outros mediadores demonstram uma tendência à significância estatística: IL-10 ($P = 0,056$), IL-13 ($P = 0,056$), IL-5 ($P = 0,056$), IL-7 ($P = 0,056$), MIG ($P = 0,056$) e IL-15 ($P = 0,074$).

Figura 4 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando apenas o histórico de neuroarbovirose sob estímulo de CHIKV



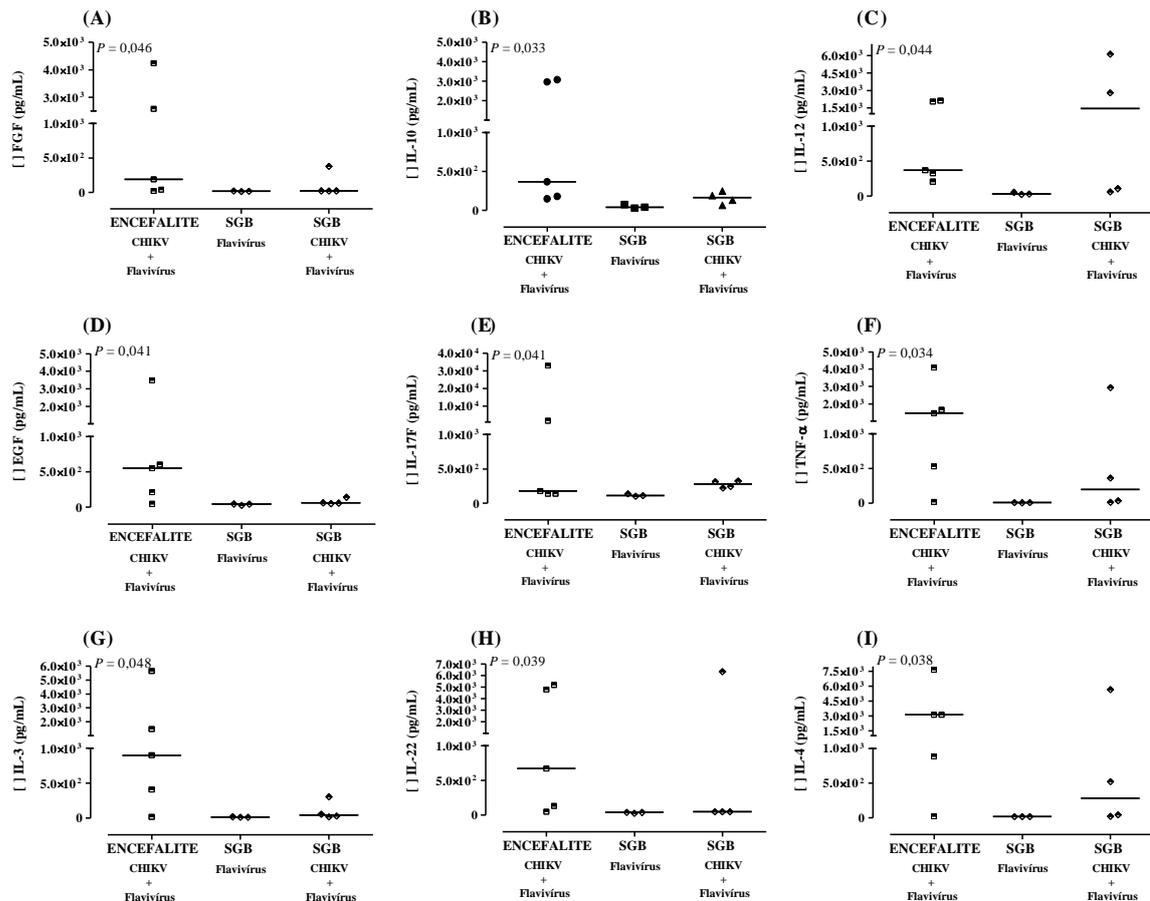
Fonte: O autor.

Legenda: (A-I) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de CHIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite. ENCEFALITE (n = 6) e SGB (n = 10). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Mann-Whitney para os casos não paramétricos e Levene+Teste t (considerando igualdade de variâncias assumidas ou não) para testes paramétricos.

Posteriormente, nós comparamos os níveis dos mediadores solúveis nas culturas dos pacientes com histórico de encefalite por CHIKV (n = 3), ou infecção múltipla por flavivírus e CHIKV (n = 2), e não encontramos diferença estatística ($P > 0,2$), sugerindo que independente da etiologia do agente infeccioso as respostas imune de memória nos pacientes com histórico de encefalite foram semelhantes. Contudo, comparando os níveis dos mediadores solúveis em cultura de pacientes com histórico de SGB por flavivírus (n = 3), ou infecção múltipla por flavivírus (DENV e ZIKV) e CHIKV (n = 4), encontramos na infecção múltipla o aumento nos níveis de IL-4, IL-2R, IL-7, TNF α , IL-9, IL-17F, HGF, EGF, GM-CSF, Eotaxin e IL-12 em resposta ao estímulo com CHIKV; o aumento de IFN- γ apenas nas culturas estimuladas com antígenos de ZIKV, e ainda o aumento de IL-2, IL-17A, IL-22, IL-13 e FGF em resposta ao estímulo com ambos os antígenos, de CHIKV e ZIKV, mas em todos os

à significância estatística entre os mediadores IL-17A ($P = 0,066$), GMCSF ($P = 0,069$), IL-15 ($P = 0,059$), IL-1 α ($P = 0,071$), IL-9 ($P = 0,056$), IL-1RA ($P = 0,077$), IL-7 ($P = 0,061$) e IL-2R ($P = 0,051$), todos aumentados nas células de portadores de encefalite.

Figura 6 – Perfil de resposta imunológica de memória considerando histórico de neuroarbovirose secundário à infecção por arbovírus sob estímulo de CHIKV



Fonte: O autor.

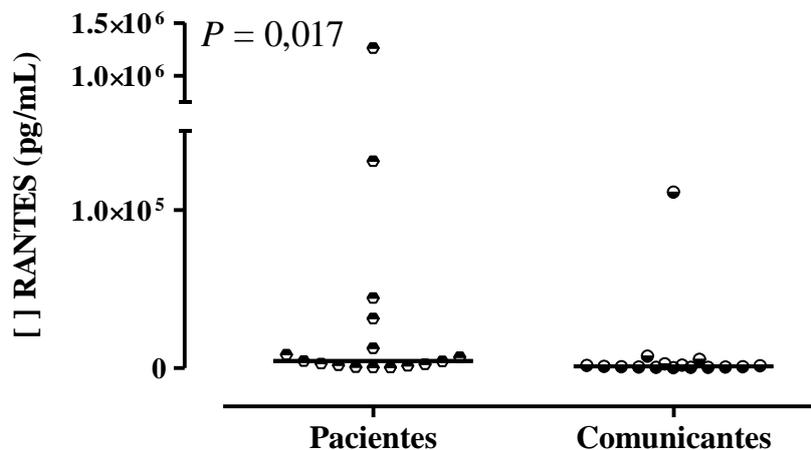
Legenda: (A-B; D-I) Mediadores solúveis diferencialmente expressos sob estímulo de CHIKV e que demonstraram aumento nos casos de encefalite secundária à infecção por CHIKV e flavivírus. (C) Mediador solúvel com expressão aumentada em portadores de SGB secundária à infecção por CHIKV e flavivírus ENCEFALITE secundária à infecção por flavivírus + CHIKV ($n = 5$), SGB secundária à infecção por flavivírus ($n = 3$) e SGB secundária à infecção por flavivírus + CHIKV ($n = 4$). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Kruskal-Wallis.

Perfil imunológico de pacientes com histórico de neuroarbovirose em relação ao seu comunicante intradomiciliar

A resposta imune de memória de pacientes com histórico de neuroarbovirose, encefalite e SGB, em relação a resposta de seu comunicante intradomiciliar não geneticamente relacionado (cônjuge), exposto a fonte de

infecção, mas sem a doença clínica, foi avaliada em PBMCs frente ao desafio com os estímulos ZIKV e CHIKV. Na presença do estímulo com CHIKV, os pacientes apresentaram uma tendência estatística ao aumento da expressão de MIP-1 α ($P = 0,073$); enquanto o estímulo com ZIKV induziu um aumento na expressão de RANTES ($P = 0,017$) (Figura 7).

Figura 7 – Perfil imunológico de pacientes com histórico de neuroarbovirose em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulo de ZIKV

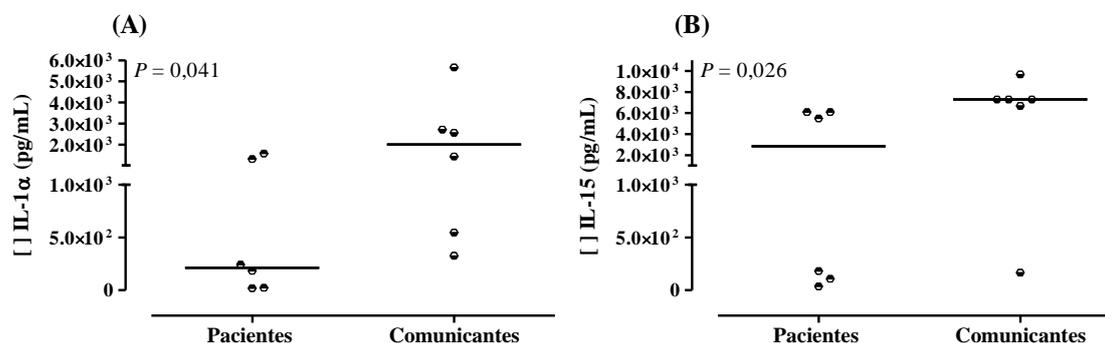


Fonte: O autor.

Legenda: Mediador solúvel diferencialmente expresso sob estímulo de ZIKV e que demonstra aumento nos casos de pacientes portadores de neuroarbovirose. Pacientes e comunicantes ($n = 16$, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk e Kolmogorov-Smirnov; estatística realizada com Mann-Whitney.

Em relação a encefalite, os comunicantes apresentaram aumento dos níveis de IL-1 α ($P = 0,041$) no sobrenadante das culturas estimuladas com antígenos de ZIKV (Figura 8A), e de IL-15 ($P = 0,026$) quando o estímulo foi o antígeno de CHIKV (Figura 8B) em relação aos seus respectivos familiares com encefalite.

Figura 8 – Perfil imunológico de pacientes com histórico de encefalite, secundária a infecção por arbovírus, em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulos de ZIKV e CHIKV

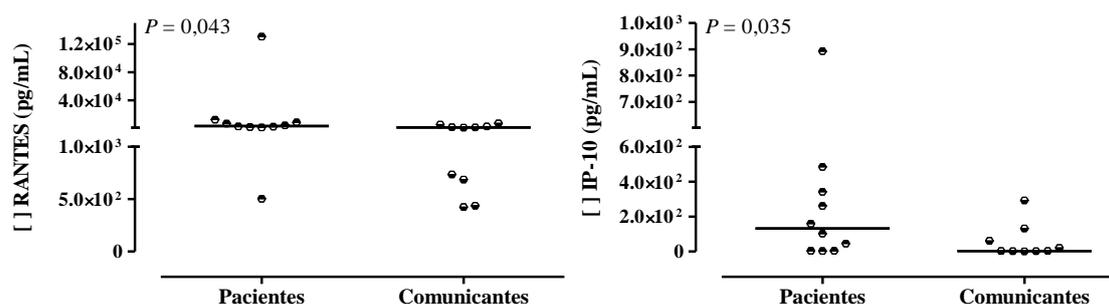


Fonte: O autor.

Legenda: (A) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de ZIKV em relação a pacientes com encefalite secundária à infecção por arbovírus. (B) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de CHIKV em relação a pacientes com encefalite secundária à infecção por arbovírus. Pacientes e comunicantes (n = 6, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Mann-Whitney.

Por outro lado, os pacientes com histórico da SGB apresentaram aumento dos níveis de RANTES ($P = 0,043$) em sobrenadante da cultura de PBMCs estimuladas com antígeno de ZIKV (Figura 9A), e aumento nos níveis de IP-10 ($P = 0,035$) ao estímulo com antígenos de CHIKV (Figura 9B), em relação aos níveis obtidos com PBMCs dos seus comunicantes intradomiciliares.

Figura 9 – Perfil imunológico de pacientes com histórico de SGB, secundária a infecção por arbovírus, em relação ao seu comunicante intradomiciliar, sob estímulos de ZIKV e CHIKV



Fonte: O autor.

Legenda: (A) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de ZIKV em relação a pacientes com SGB secundária a infecção por arbovírus. (B) Mediador solúvel diferencialmente expresso em comunicantes sob estímulo de CHIKV em relação a pacientes com SGB secundária a infecção por arbovírus. Pacientes e comunicantes (n = 10, cada). Teste de normalidade realizado com Shapiro-Wilk; estatística realizada com Mann-Whitney.

DISCUSSÃO

O perfil de expressão de 36 moléculas solúveis foi avaliado em 16 pacientes com manifestações neurológicas (encefalite e SGB) secundárias a infecção por arbovírus (DENV, ZIKV e CHIKV) e seus respectivos comunicantes. Os pacientes com neuroarbovirose estavam na fase convalescente da infecção, diante disso, o perfil de mediadores produzidos por suas PBMCs estimuladas com antígenos de diferentes arbovírus correspondem a uma avaliação da imunidade de memória desses indivíduos; além disso, comparamos o perfil de mediadores produzidos pela análise dos PBMCs dos seus comunicantes intradomiciliares não geneticamente relacionados (cônjuge), a fim de verificar a diferença na modulação da resposta imunológica que possa ter contribuído para o desenvolvimento do quadro neurológico, assumindo que ambos paciente e comunicante tiveram o mesmo grau de exposição viral.

A principal limitação desse estudo é o número de duplas paciente/comunicante analisado, em consequência às dificuldades no recrutamento dos cônjuges devido a sua atividade laboral e a distância do hospital. O agendamento com duplas de participantes foi realizado por telefone e de forma recorrente cancelado pela dificuldade de deslocamento dos voluntários da pesquisa. Outro limitante foi a execução do experimento, desenhado para avaliar simultaneamente a imunidade humoral e a imunidade celular (não apresentada) das PBMCs dos pacientes e comunicantes em seis diferentes condições de crescimento, onde o tempo de experimentação completa é de uma semana, sendo possível realizar no máximo duas duplas por semana. Ainda, os pacientes variaram em relação a apresentação clínica da doença, encefalite ou SGB, e a infecção quanto ao agente etiológico único ou múltiplo, tendo contribuído para que as respostas imunológicas de memória desses indivíduos se apresentassem de forma complexa e variável. Como consequência dessa variabilidade mesmo analisando as medianas dos níveis dos mediadores solúveis não foi possível atingir a significância em algumas análises, desta forma optamos por analisar o perfil de expressão das diferentes moléculas comparando a proporção entre as medianas das moléculas nas diferentes análises realizadas.

Nós observamos que quando comparados os grupos de pacientes com seus comunicantes houve um aumento de IL-1 α e IL-15 nos comunicantes e sob os estímulos de ZIKV e CHIKV, respectivamente dentro do quadro clínico de encefalite,

o que aponta para o fato de que possivelmente os comunicantes apresentam uma resposta pró-inflamatória mais intensa, atuando no recrutamento de células efetivas como os linfócitos T e NK, além de promover a produção de mais mediadores inflamatórios; além disso já foi visto que a IL-1 α interage diretamente no SNC induzindo febre, combinadas essas ações sugerem uma ativação massiva do sistema imune nos comunicantes, favorecendo então o clearance viral e inibindo a progressão para o quadro neurológico de encefalite. Quando essa comparação foi realizada entre os portadores de SGB e seus comunicantes, foi visto um aumento das quimiocinas RANTES e IP-10 sob os estímulos de ZIKV e CHIKV, respectivamente, nos pacientes; esses mediadores atuam no recrutamento de células efetivas do sistema imunológico, entretanto, quando em excesso, podem promover danos no sistema neurológico, inclusive, conforme mencionado no referencial teórico, a quimiocina IP-10 tem sido apontada como responsável pela apoptose de células neurais na SGB, além de ter sido visto um aumento significativo dessa quimiocina em mulheres gestantes portando fetos com mal formação congênita (microcefalia) associada à arbovírus (ZIKV) (COMMINS, BORISH, STEINKE, 2010; KAM et al., 2017; NAVECA et al., 2018; TAPPE et al. 2015).

Apesar das limitações do presente estudo, alguns importantes aspectos da patogênese da doença foram esclarecidos. A maior frequência de encefalite causada por CHIKV e de SGB por ZIKV descrita na literatura (FERREIRA et al., 2020), pode ser explicada pela maior antigenicidade do CHIKV, resultando na expressão de mediadores inflamatórios de forma exacerbada, incluindo RANTES, IL-8, MCP-1 e IL-6, que contribui para a permeabilidade da barreira hematoencefálica, mas também associado a uma menor ou mais lenta resposta antiviral em decorrência de menores níveis de IL-15 em resposta ao desafio antigênico com CHIKV, conforme demonstramos em relação ao desafio das células dos comunicantes (ALMEIDA et al., 2021; MEHTA et al., 2018). Já nos pacientes de SGB a resposta a arbovírus foi caracterizada pela maior produção de quimiocinas RANTES e IP-10 em relação aos comunicantes, com aparente resposta antiviral semelhante aos dos comunicantes, talvez porque os comunicantes e pacientes já tinham entrado em contato com DENV, endêmico na região, que pelo compartilhamento de epítomos antigênicos com ZIKV, tenha induzido uma resposta de memória semelhante em todos os participantes.

REFERÊNCIAS

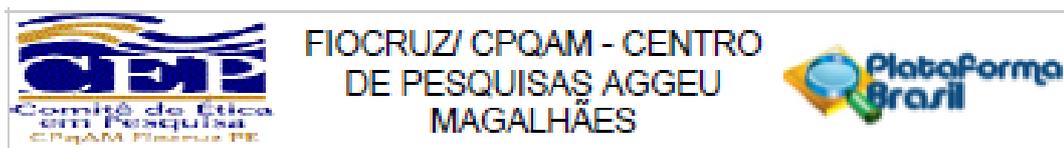
- ALMEIDA, R. S. *et al.* Cytokines and Soluble HLA-G Levels in the Acute and Recovery Phases of Arbovirus-Infected Brazilian Patients Exhibiting Neurological Complications. Frontiers in Immunology, Lausanne, v. 12, mar. 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33776990/>. Acesso em: 20 out. 2021.
- BRASIL. Secretaria de Vigilância em Saúde. Coordenação-Geral de Desenvolvimento da Epidemiologia em Serviços. Guia de Vigilância em Saúde. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde, 2019. Disponível em: <http://portal.anvisa.gov.br/documents/33852/3507912/Caderno+3+-+Critérios+Diagnósticos+de+Infecção+Associada+à+Assistência+à+Saúde+Neonato/9fa7d9be-6d35-42ea-ab48-bb1e068e5a7d>. Acesso em: 6 maio 2021.
- CERNY, T. *et al.* The Range of Neurological Complications in Chikungunya Fever. Neurocritical Care, Totowa, v. 27, n. 3, p. 447–457, maio 2017.
- COMMINS, S. P.; BORISH, L.; STEINKE, J. W. Immunologic messenger molecules: Cytokines, interferons, and chemokines. Journal of Allergy and Clinical Immunology, St. Louis, v. 125, n. 2, p. S53–S72, fev. 2010.
- FERREIRA, M. L. B. *et al.* Guillain–Barré syndrome, acute disseminated encephalomyelitis and encephalitis associated with Zika virus infection in Brazil: Detection of viral RNA and isolation of virus during late infection. The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, Baltimore, v. 97, n. 5, p. 1405–1409, nov. 2017.
- KAM, Y. W. *et al.* Specific biomarkers associated with neurological complications and congenital central nervous system abnormalities from Zika virus-infected patients in Brazil. The Journal of Infectious Diseases, [s. l.], v. 216, n. 2, p. 172–181, maio 2017. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jix261>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- MARTELLI-PALOMINO, G. *et al.* Polymorphic sites at the 3'untranslated region of the HLA-G gene are associated with differential hla-g soluble levels in the Brazilian and French population. PloS one, San Francisco, v. 8, n. 10, p. 1-10, 2013.
- MEHTA, R. *et al.* The neurological complications of chikungunya virus: A systematic review. Reviews in Medical Virology, Chichester, v. 28, n. 3, p. 1-24, abr. 2018.
- MEYDING-LAMADÉ, U.; CRAEMER, E.; SCHNITZLER, P. Emerging and re-emerging viruses affecting the nervous system. Neurological Research and Practice, [s. l.], v. 1, n. 1, p. 1–9, jun. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s42466-019-0020-6>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- MUSTAFÁ, Y. M. *et al.* Pathways exploited by flaviviruses to counteract the blood-brain barrier and invade the central nervous system. Frontiers in microbiology, [s. l.], v. 10, [s. n.], p. 1-14, mar. 2019. Disponível em: <https://doi.org/10.3389/fmicb.2019.00525>. Acesso em: 16 abr. 2022.
- NAVECA, F. G. *et al.* Analysis of the immunological biomarker profile during acute zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 113, n. 6, p. 1–13, 2018.
- SALLES, T. S. *et al.* History, epidemiology and diagnostics of dengue in the

American and Brazilian contexts: a review. Parasites & Vectors, London, v. 11, n. 264, p. 1–12, abr. 2018.

TAPPE, D. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. Medical Microbiology and Immunology, Berlin, v. 205, n. 3, p. 269–273, dez. 2015.

VIEIRA, M. A. da C. e. S. *et al.* Potential role of dengue virus, chikungunya virus and zika virus in neurological diseases. Memórias do Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, v. 113, n. 11, p. 1–6, set. 2018.

ANEXO – APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA DO IAM



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Complicações neurológicas pós-infecção por ZIKA: contribuição de moléculas/genes de histocompatibilidade, receptores leucocitários, citocinas e fatores pós-transcricionais

Pesquisador: Norma Lucena Cavalcanti Lidho da Silva

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 63883517.4.0000.5190

Instituição Proponente: FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.988.721

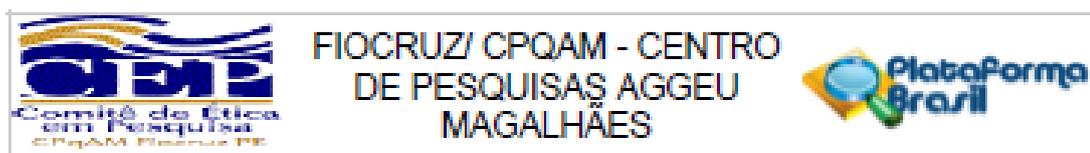
Apresentação do Projeto:

: O projeto está escrito em linguagem clara e concisa, bem referenciado. Traz várias metas, das quais algumas estarão envolvendo a participação de seres humanos, nas quais o pesquisador explicitou etapa por etapa. O projeto irá avaliar a associação de polimorfismos nos genes HLA e seus receptores no desenvolvimento das complicações neurológicas da Infecção por ZIKV, propõe-se o estudo de associação tipo caso-controle, cujos casos serão os pacientes com mais de 18 anos, com diagnóstico clínico e laboratorial de Infecção por arbovirus com manifestações neurológicas atendidos no Setor de Neurologia do Hospital da Restauração em Recife, e que estejam cadastrados no projeto "Manifestações neurológicas associados a Infecção por Zika virus (CAAE:51106115.8.0000.5190)"

Objetivo da Pesquisa:

Avaliar a diversidade dos genes de histocompatibilidade e de receptores importantes de interação com os de histocompatibilidade em pacientes infectados pelo ZIKV apresentando ou não complicações neurológicas. Além de simples associações, o estudo prevê aplicações translacionais, incluindo estudos de bioinformática para avaliar a interação dos alelos HLA associados com as complicações com peptídeos virais que podem ser úteis para o desenvolvimento de vacinas. Para entender a modulação desses genes e a modulação do sistema imune nesses pacientes, vamos

Endereço: Av. Prof. Moraes Rogo, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2630 Fax: (81)2101-2630 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.995.721

estudar fatores plasmáticos regulatórios, incluindo microRNAs, citodinas e HLA-G solúvel. Ainda, os microRNAs diferencialmente expressos serão avaliados funcionalmente em relação ao seu papel modulador sobre as moléculas de histocompatibilidade.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

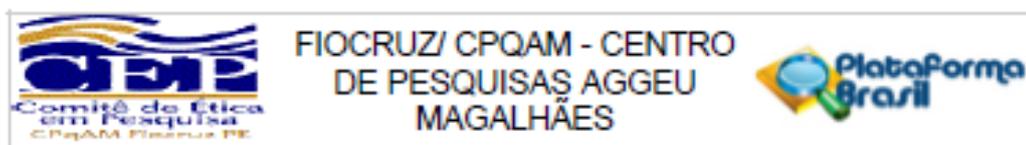
Riscos: Considerando os aspectos éticos, dois pontos devem ser esclarecidos: primeiro, os casos estudados nessa proposta são participantes voluntários do projeto supra citado, não havendo necessidade de entrevista, mas precisaremos ter acesso às informações clínicas e epidemiológicas dos pacientes com diagnóstico confirmado de arbovirose; segundo, após explicar o objetivo do presente estudo aos CASOS (que estão sendo acompanhados pela pesquisadora Dra Lúcia Brito no Hospital da Restauração) durante uma das consultas de acompanhamento, o convite será direcionado a ele e estendido aos seus comunicantes, caso seja aceito, será solicitado ao paciente e comunicante que assine o termo de consentimento livre e esclarecido, responda a um questionário e permita a coleta de 4 mL de sangue (o equivalente a uma colher de sobremesa). Considerando, que o comunicante não deseje participar do estudo e não deseje ser contactado, de forma a minimizar o constrangimento iremos encaminhar pelo caso Index um folder explicando o projeto e posteriormente contactaremos o caso para agendarmos um encontro com aquele comunicante que desejar participar da pesquisa. O risco relativo a punção venosa dos comunicantes é raro, mas possível, e consiste no extravasamento de sangue durante a punção, causando hematoma e dor no antebraço, mas para minimizar esse risco iremos utilizar material descartável de qualidade e pessoal treinado para a coleta, caso seja necessário, estará disponível gel tópicos para minimizar a dor local.

Benefícios: Devido ao tempo longo necessário para a pesquisa, pode ser que o paciente possa não usufruir diretamente dos resultados do estudo, mas esperamos identificar substâncias que possam ser utilizadas como marcadores de gravidade e de cura e que possam no futuro contribuir para desenvolvimento de métodos de diagnóstico, e descoberta de medicamentos que permitam uma recuperação mais rápida dos casos graves de infecção por esses vírus.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

apesar de não trazer benefícios diretos para os participantes, devido ao longo prazo de certas análises, parece que os resultados serão de grande valia o melhor entendimento da contribuição genética do indivíduo frente a infecção pelo vírus Zika.

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2639 Fax: (81)2101-2639 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.968.721

Ausência	TECLEcasosARBOVIROSE.docx	18/01/2017 16:35:43	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
Outros	ProjetoInicialCEPfalma.pdf	18/01/2017 16:32:51	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
Outros	AnuenciaNorma.jpg	18/01/2017 16:28:28	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
Outros	AnuendaLuca.jpg	18/01/2017 16:28:04	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
Outros	AnuendaDonadl.jpg	18/01/2017 16:27:34	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
Folha de Rosto	RostroCARBO.pdf	18/01/2017 16:26:07	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

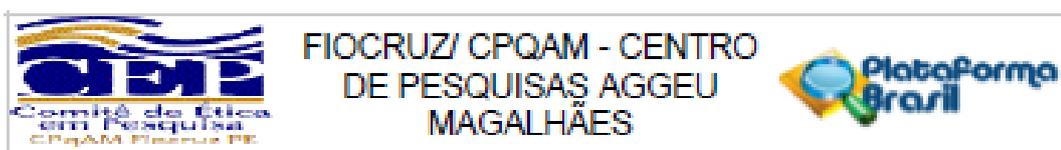
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RECIFE, 29 de Março de 2017

Assinado por:
Janaina Campos de Miranda
(Coordenador)

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.670-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2630 Fax: (81)2101-2630 E-mail: comiteetica@cpqam.fiocruz.br



Continuação do Parecer: 1.988.721

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os documentos e declarações exigidos pelo sistema CEP/CONEP foram devidamente apresentados.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O referido projeto, nesta versão, atende às exigências do sistema CEP/CONEP, assim como atende ao previsto na RES. CNS 466/12.

Considerações Finais a critério do CEP:

O Comitê avaliou e considera que os procedimentos metodológicos do Projeto em questão estão condizentes com a conduta ética que deve nortear pesquisas envolvendo seres humanos, de acordo com o Código de Ética, Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde, de 12 de dezembro de 2012 e complementares.

O projeto está aprovado para ser realizado em sua última formatação apresentada ao CEP.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Outros	Carta_Anuencia_zika_Miguel.pdf	29/03/2017 11:34:48	Janaina Campos de Miranda	Acelto
Outros	anuencia_fatima_militao.pdf	29/03/2017 11:32:46	Janaina Campos de Miranda	Acelto
Outros	Declaracao_relatorio.pdf	29/03/2017 11:32:16	Janaina Campos de Miranda	Acelto
Brochura Pesquisa	Neuro_ZIKA_FormatoCEP.docx	29/03/2017 11:31:55	Janaina Campos de Miranda	Acelto
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_855101.pdf	18/01/2017 16:46:28		Acelto
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	ProjetoZIKAcomunicante.pdf	18/01/2017 16:44:03	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TECLEcomunicanteARBOVIROSE.docx	18/01/2017 16:35:56	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de	TECLEcasosARBOVIROSE.docx	18/01/2017 16:35:43	Norma Lucena Cavalcanti Licínio da Silva	Acelto

Endereço: Av. Prof. Moraes Rego, s/nº
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 50.870-420
 UF: PE Município: RECIFE
 Telefone: (81)2101-2630 Fax: (81)2101-2630 E-mail: comiteetico@cpqam.fiocruz.br