

Ministério da Saúde
Fundação Oswaldo Cruz
Instituto René Rachou
Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde

**AVALIAÇÃO DE ASSINATURAS GÊNICAS EM PACIENTES COM FEBRE
AMARELA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO**

Por
Isabela Thamara Sabino Dutra

Belo Horizonte

2021

DISSERTAÇÃO MCS-IRR

I.T.S.DUTRA

2021

ISABELA THAMARA SABINO DUTRA

**AVALIAÇÃO DE ASSINATURAS GÊNICAS EM PACIENTES COM FEBRE
AMARELA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Marina de Moraes Mourão

Coorientação: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e Dra. Sandra Grossi Gava

Belo Horizonte

2021

Catálogo-na-fonte
Rede de Bibliotecas da FIOCRUZ
Biblioteca do IRR
CRB/6 3740/00

P276h
2022

Dutra, Isabela Thamara Sabino.

Avaliação de assinaturas gênicas em pacientes com febre amarela para identificação de biomarcadores de prognóstico / Isabela Thamara Sabino Dutra – Belo Horizonte, 2021

XVII, 113 f. il.; 210 x 297mm.

Bibliografia: f. 100-113

Dissertação (mestrado) – Dissertação para obtenção do título de Mestre em Ciências pelo Programa de Pós - Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou. Área de concentração: Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

1. Febre amarela 2. Hepatite 3. Biomarcadores 4. Expressão gênica 5. Prognóstico. I. Título. II. Mourão, Marina de Moraes (Orientação). III. Carvalho, Andréa Teixeira de (Coorientação). IIII. Gava, Sandra Grossi (Coorientação).

CDD – 22. ed. – 616.918

ISABELA THAMARA SABINO DUTRA

**AVALIAÇÃO DE ASSINATURAS GÊNICAS EM PACIENTES COM FEBRE
AMARELA PARA IDENTIFICAÇÃO DE BIOMARCADORES DE PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Ciências – Área de Concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática.

Orientação: Dra. Marina de Moraes Mourão

Coorientação: Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e Dra. Sandra Grossi Gava

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Marina de Moraes Mourão (IRR – FIOCRUZ/ MG) Orientadora/Presidente

Prof^a. Dr^a. Viviane Cristina Fernandes dos Santos (IRR – FIOCRUZ/ MG) Titular

Prof^a. Dr^a. Izabela Maurício de Rezende (Stanford University School of Medicine)
Titular

Prof. Dr. Pedro Augusto Alves (IRR – FIOCRUZ/ MG) Suplente

Dissertação defendida e aprovada em Belo Horizonte, 29/10/2021

Dedico esse trabalho a Jeová Deus, conhecedor de toda a ciência.

Somos instrumentos e extensão do seu amor ao mundo!

"Por meio disto chegamos a conhecer o amor: ele entregou a vida por nós, e nós temos a obrigação de entregar a vida pelos nossos irmãos." (1Jo 3:16).

AGRADECIMENTOS

À Jeová, que nunca deixou ou deixará de me proteger, guiar e amar!

À Dra. Marina Mourão, minha querida orientadora, de projeto e vida! Sou e serei sempre grata por me proporcionar tanto crescimento (em tantas áreas), por ter me apoiado no momento de maior necessidade, pelos “puxões de orelha”, por me aconselhar e se preocupar comigo! É uma honra poder ser sua aluna!

À Dra. Sandra Gava, minha querida coorientadora, que sempre se fez disponível a ouvir e ajudar! Gratidão pelo apoio em tantos momentos, pelo carinho que sempre demonstrou e pelas contribuições fantásticas! Este trabalho não poderia ser realizado sem você! Sou extremamente honrada por ser sua aluna!

À Dra. Andréa Teixeira de Carvalho, minha querida coorientadora, que contribuiu com excelência para o desenvolvimento deste trabalho. Gratidão por nos ensinar tanto! Foi uma honra trabalhar com você!

Às agências de fomento, por me concederem bolsa de estudos e financiarem este projeto e todos os insumos e equipamentos necessários para sua realização.

Ao Instituto René Rachou, pela estrutura de excelência.

Ao Programa, professores e funcionários, da Pós-graduação em Ciências da Saúde do Instituto René Rachou, por me possibilitar tanto aprendizado.

À Biblioteca do IRR, em prover acesso gratuito local e remoto à informação técnico-científica em saúde custeada com recursos públicos federais, integrando o rol de referências desta dissertação, e pela catalogação e normalização da mesma.

Ao Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do Instituto René Rachou, em especial à Jordana Rodrigues Barbosa Fradico, que me auxiliou em dezenas de etapas deste trabalho. Gratidão por contribuir tanto e se colocar em prontidão para me auxiliar.

À Plataforma de PCR em tempo real do Instituto René Rachou, em especial à Viviane Cristina Fernandes dos Santos. Gratidão por me instruir e auxiliar, com tanto zelo e carinho, na realização das tantas placas de qPCR e nas análises!

Aos membros da banca examinadora, pela disponibilidade e contribuição neste trabalho.

Ao Hospital Eduardo de Menezes, por fornecer as informações necessárias sobre os pacientes incluídos no projeto.

Ao Laboratório de Vírus da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), especialmente a Dra. Betânia Paiva Drumond, Dra. Izabela Maurício de Rezende e Thais Alkifeles Costa. Gratidão por disponibilizarem tempo, amostras e ajuda na realização deste projeto!

À assessoria científica da empresa Thermo Fisher Scientific.

À Taís Nóbrega de Sousa, por me auxiliar no delineamento de futuras análises de polimorfismos.

Aos amigos e colegas do HMM (Cris, Gabi, Amandinha, Fê, Ju, Felipe, Bella, Nai, Silvia, Victor, Roberta, Cristiano, Cristiane e Omar), por tudo o que vocês fazem por mim! Amo tanto vocês!

À Ester Silva Souza dos Santos, por me auxiliar nessa reta final!

Aos que, de alguma forma, auxiliaram neste trabalho, minha gratidão!

Ao meu amado marido! Não tenho palavras para expressar minha gratidão por me apoiar e amar, independente do que eu decida fazer! Tenho orgulho de saber que estamos formando uma linda família e que estaremos sempre presentes um para o outro! Este trabalho, e tantas outras coisas, só foram possíveis porque você esteve (e está) ao meu lado! Gratidão, meu amor!

À minha mãe, que sempre se dedicou a cuidar de mim e dos meus irmãos, por me amar, me apoiar e me ensinar a lutar pelos meus sonhos!

À minha família, em especial meus irmãos (Gu, Dudu, Nina, Lalá e Clarice), minha vó (Bel) e minha tia (Tati), por me apoiarem, me amarem e estarem ao meu lado! Amo vocês!

À minha outra família, Ronaldo, Rita e Cíntia! Gratidão por me acolherem e amarem! Amo vocês!

Aos meus amigos, Rany, Jess, Lulu, Di e Barb. São tantos momentos de amor, auxílio, aprendizagem e carinho, que nem mil agradecimentos bastam! Vocês são meu tesouro!

À minha querida amiga Kemily. Você me socorreu nos momentos de maior aflição!

Você me ensina a amar Jeová e a confiar nele! Você me demonstra, todos os dias, como ser uma pessoa boa, amável e gentil! Gratidão por estar em minha vida e por me auxiliar nesta jornada! Essa conquista é nossa!

Aos que não se encontram presentes, minha gratidão! Meu querido avô, “Tião”, o senhor foi e sempre será meu amado avôhai! Meu amado filho, meu amor durará para sempre! Querido “Zezinho”, você sempre estará presente!

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

A febre amarela é uma doença hemorrágica, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus*, acometendo cerca de 200 mil pessoas anualmente em mais de 40 países, incluindo o Brasil. Entre 2016 e 2018 houve importantes surtos da doença, acometendo mais de duas mil pessoas, principalmente na região sudeste do país. Também foi relatado que alguns pacientes apresentaram quadro de hepatite de recidiva tardia após melhora clínica e laboratorial, entre 40 e 70 dias após os sintomas iniciais, com presença do vírus confirmada em fragmento de biópsia hepática. Diante disso, o presente estudo buscou avaliar um painel de 44 genes envolvidos em vias de sinalização, no processo de ativação da coagulação, no reconhecimento de produtos imunogênicos, em eventos hemorrágicos e nas funções de imunidade inata, inflamação e apoptose, em pacientes curados e pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, a fim de se correlacionar os perfis de expressão desses genes com o prognóstico da doença. Primeiramente, foram realizadas padronizações de extrações de RNA, definindo protocolos que priorizam maiores rendimentos de RNA na extração. Assim, as amostras processadas por *Cell strainer* apresentaram maior rendimento pelo método do TRIzol™ Reagent e para as amostras armazenadas como fragmentos de coágulo ficou estabelecida a utilização apenas do TRIzol™ Reagent em contato com a superfície dos fragmentos. Para a síntese de cDNA, o melhor desempenho foi do Kit High-Capacity cDNA Reverse Transcription; e para as extrações de DNA, o kit QIAamp® DNA Blood Mini. Foram obtidas e utilizadas em extrações de RNA e/ou DNA, 124 amostras de pacientes do surto de 2017-2018, divididas em: pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, amostras coletadas no período de 07 a 15 dias (FA 07-15d), 16 a 35 dias (FA 16-35d), e 61 a 90 dias após início dos sintomas (FA 61-90d); e pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, amostras coletadas no período de 07 a 15 dias (Hep 07-15d), 16 a 35 dias (Hep 16-35d) e 61 a 90 dias após início dos sintomas (Hep 61-90d). Foram realizados ensaios TaqMan® Array Cards com RNAs de 80 amostras. Foram utilizados como genes de referência os transcritos de GAPDH e ACTB por serem expressos de forma mais estável nas amostras analisadas. As análises estatísticas foram realizadas com os valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$. Os marcadores CASP3, CASP8, CXCR1, IL18, MAPK3, FAS e FCGRT foram diferencialmente expressos entre os indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, nos períodos 07-15d e 16-35d, quando comparado com indivíduos que apresentaram hepatite de recidiva tardia, nos mesmos períodos. A análise de assinaturas ascendentes de biomarcadores mostrou que IL18, TNFRSF1A, CXCL2, CASP3, e IL6, envolvida em reparo de danos hepáticos, são mais frequentes no grupo FA 16-35d, enquanto IL27 é mais frequente no grupo Hep 07-15d, indicando que esses genes podem ser possíveis biomarcadores de prognóstico para a hepatite de recidiva tardia. A via de resposta imunológica do papel da PKR na resposta celular antiviral induzida por estresse é a mais representativa que engloba os genes selecionados para o estudo (CASP3, CASP8, IFNA2, IFNB1, IFNG, IL6, IL10, MAPK1, MAPK3, NFKB1, TLR3 e TNFRSF1A).

Palavras-chave: febre amarela, hepatite de recidiva tardia, biomarcadores de prognóstico.

ABSTRACT

Yellow fever is a hemorrhagic disease, caused by arboviruses of the genus *Flavivirus*, affecting about 200,000 people per year in more than 40 countries, including Brazil. There were two disease outbreaks between 2016 and 2018, with more than 2,000 human cases, affecting mainly the southeastern region of Brazil. It was also reported that some patients presented late-relapsing hepatitis after clinical and laboratorial biomarkers improvement, after 40 and 70 days from the initial symptoms, with the presence of the virus confirmed in a liver biopsy fragment. Therefore, the present study searches to evaluate a panel of 44 genes involved in signaling pathways, coagulation activation process, recognition of immunogenic products, hemorrhagic events, and the functions of innate immunity, inflammasomes, and apoptosis, in patients cured and with late-relapsing hepatitis, to correlate the expression profiles of these genes with the disease prognosis. First, standardization of RNA extractions was performed, defining protocols prioritizing higher quantities of RNA in extraction. Thus, samples processed by Cell strainer showed higher quantities by the TRIzol™ Reagent method and for samples stored as clot fragments, it was established the use of the TRIzol™ Reagent supernatant, which was in contact with the clot fragments surface. For cDNA synthesis, the best performance was the High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit; and for DNA extractions, the QIAamp® DNA Blood Mini Kit. 124 samples from patients from the 2017-2018 outbreak were obtained and used in RNA and/or DNA extractions, divided into: patients who had yellow fever and effectively cured, samples collected in 07 to 15 days (FA 07 -15d), 16 to 35 days (FA 16-35d) and 61 to 90 days after symptom onset (FA 61-90d); and patients with late-relapsing hepatitis, samples collected in 07 to 15 days (Hep 07-15d), 16 to 35 days (Hep 16-35d) and 61 to 90 days after symptom onset (Hep 61-90d). Assays with customized TaqMan® Array Cards containing 44 genes were performed with RNAs from 80 samples. GAPDH and ACTB transcripts were used as reference genes, as they were more stably expressed in the samples analyzed. Statistical analyzes were performed with $2^{-\Delta C_t}$ values. The CASP3, CXCL1, CXCR1, IL6, MAPK3, FAS, ELANE, and FCGRT markers were differentially expressed among individuals who had yellow fever and were effectively cured, in the periods 07-15d and 16-35d, when compared to individuals who had late-relapsing hepatitis, in the same periods. The analysis of ascendant biomarker signatures showed that IL18, TNFRSF1A, CXCL2, CASP3, and IL6, involved in liver damage repair, are more frequent in the FA 16-35d group, while IL27 is more frequent in the Hep 07-15d group, indicating that these genes may be possible prognostic biomarkers. The pathway of the role of PKR in stress-induced antiviral cell response is the most representative metabolic pathway of the genes selected for the study (CASP3, CASP8, IFNA2, IFNB1, IFNG, IL6, IL10, MAPK1, MAPK3, NFKB1, TLR3, and TNFRSF1A).

Key words: yellow fever, late-relapsing hepatitis, prognostic biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1. Esquema da organização e processamento do genoma viral de membros do gênero <i>Flavivirus</i> da família <i>Flaviviridae</i> | 19 |
| Figura 2. Multiplicação dos vírus da família <i>Flaviviridae</i> | 20 |
| Figura 3. Ocorrência de febre amarela no mundo (1970-2016)..... | 22 |
| Figura 4. Ciclos de transmissão da febre amarela..... | 23 |
| Figura 5. Receptores <i>Toll-like</i> humanos e seus ligantes..... | 26 |
| Figura 6. Disseminação do vírus da febre amarela no Brasil (1980-2016)..... | 34 |
| Figura 7. Genes selecionados e suas posições nos ensaios TaqMan® Array Cards..... | 59 |
| Figura 8 – Esquema ilustrado da via “Resposta imunológica – Papel da proteína quinase dependente de RNA (PKR) na resposta celular antiviral induzida por estresse” – MetaCore..... | 96 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|---|----|
| Gráfico 1. Valores de variabilidade de expressão dos genes normalizadores (18S, ACTB e GAPDH) utilizando NormFinder..... | 62 |
| Gráfico 2. Expressão de CASP3, CASP8 e CASP9 nas amostras, por grupo... | 63 |
| Gráfico 3. Expressão de CCL4, CCL19 e CCL21 nas amostras, por grupo..... | 65 |
| Gráfico 4. Expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL10 e CXCL12 nas amostras, por grupo..... | 66 |
| Gráfico 5. Expressão de CXCR1, CXCR2 e CXCR5 nas amostras, por grupo.. | 68 |
| Gráfico 6. Expressão de IFNA2, IFNB1 e IFNG nas amostras, por grupo.... | 70 |
| Gráfico 7. Expressão de IL1R2, IL4, IL6, IL10, IL18, IL21, IL22, IL27 e IL33 nas amostras, por grupo..... | 73 |
| Gráfico 8. Expressão de MAPK1 e MAPK3 nas amostras, por grupo..... | 75 |
| Gráfico 9. Expressão de TLR3 e TLR7 nas amostras, por grupo..... | 76 |
| Gráfico 10. Expressão de FAS, TNFRSF1A e TNFSF10 nas amostras, por grupo..... | 78 |
| Gráfico 11. Expressão de CTSG, ELANE e MPO nas amostras, por grupo..... | 80 |
| Gráfico 12. Expressão de BCL6, CSF2RB, F5, FPR1, FCGRT, LIPC, NFKB1, ROMO1 e TGFB3 nas amostras, por grupo..... | 84 |
| Gráfico 13. Análise de componentes principais do perfil de expressão dos genes analisados nas amostras..... | 86 |
| Gráfico 14. Análise de componentes principais do perfil de expressão no tempo 07-15d..... | 87 |
| Gráfico 15. Análise de componentes principais do perfil de expressão no tempo 16-35d..... | 88 |
| Gráfico 16. Análise de componentes principais do perfil de expressão no tempo 61-90d..... | 89 |
| Gráfico 17. Padrões de expressão gênica dos genes analisados nas diferentes amostras..... | 90 |
| Gráfico 18. Análise da assinatura ascendente de biomarcadores..... | 92 |
| Gráfico 19. Gráfico UpSet dos biomarcadores com frequência maior que 50% nas diferentes grupos amostrais..... | 94 |

LISTA DE TABELAS

| | |
|--|----|
| Tabela 1. Concentrações de RNA nas amostras processadas e extraídas por diferentes métodos..... | 54 |
| Tabela 2. Média dos valores de Cts obtidos pela amplificação de um fragmento do gene GAPDH em nove amostras de cDNAs, provenientes de RNAs extraídos e processados por diferentes métodos..... | 55 |
| Tabela 3. Concentrações (ng/μL) e resultados das amplificações (visualização em gel de agarose 1% ou amplificação em RT-qPCR) de um fragmento do gene ABO nas 14 amostras de DNAs extraídas por diferentes métodos..... | 57 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | | |
|---------------|---|---|
| 18S | - | RNA ribossômico 18S |
| ACTB | - | Beta-actina |
| ALT | - | Alanina aminotransferase |
| Anvisa | - | Agência Nacional de Vigilância Sanitária |
| AST | - | Aspartato aminotransferase |
| BCL6 | - | Gene da proteína 6 do linfoma de células |
| BEB | - | <i>Back Extraction Buffer</i> - Tampão de extração |
| C | - | Proteína do capsídeo viral |
| CASP | - | Caspase |
| CCL | - | Ligante de quimiocina C-C |
| CCR5 | - | Receptor de quimiocina C-C 5 |
| cDNA | - | DNA complementar |
| CAV | - | <i>Cell Fusion Agent Virus</i> – Vírus do agente de fusão celular |
| Crt | - | <i>Relative threshold cycles</i> – Ciclo de limiar relativo de amplificação |
| Cry | - | Toxinas Crystal |
| CSF2RB | - | Receptor do fator 2 estimulador de colônias subunidade beta |
| Ct | - | <i>Threshold cycle</i> – Ciclo de limiar de amplificação |
| CTSG | - | Catepsina G |
| CXCL | - | Ligante de quimiocina C-X-C |
| CXCR | - | Receptor de quimiocina C-X-C |
| CXCR5 | - | Receptor de quimiocina c-x-c tipo 5 |
| DAMPs | - | <i>Damage-associated molecular pattern</i> – Padrões moleculares associados a danos |
| DEET | - | N,N-dietil-3-metilbenzamida |
| DENV | - | <i>Dengue Virus</i> – Vírus da Dengue |
| DEPC | - | Dietilpirocarbonato |
| DNA | - | <i>Deoxyribonucleic Acid</i> – Ácido Desoxirribonucleico |
| Dr(a). | - | Doutor(a) |
| dsRNA | - | <i>Double-stranded RNA</i> – RNA fita dupla |

| | | |
|----------------|---|--|
| E | - | Proteína do envelope viral |
| ELANE | - | Elastase expressa por neutrófilos |
| ELISA | - | <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> – Ensaio de imunoabsorção enzimática |
| F5 | - | Fator de coagulação V |
| FAS | - | <i>Cell Surface Death Receptor</i> FAS – Receptor de morte de superfície celular FAS |
| FCGRT | - | Fragmento Fc do receptor e transportador de IgG |
| FcRn | - | Receptor Fc neonatal |
| FDA | - | <i>Food and Drug Administration</i> |
| Fiocruz | - | Fundação Oswaldo Cruz |
| FPR-1 | - | Receptor 1 do peptídeo formil |
| g | - | Força Gravitacional |
| GAPDH | - | Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase |
| GM-CSF | - | Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos |
| HCV | - | <i>Hepatitis C Virus</i> – Vírus da Hepatite C |
| HIV | - | <i>Human Immunodeficiency Virus</i> – Vírus da imunodeficiência humana |
| IFN | - | Interferon |
| IgG1 | - | Imunoglobulina G subclasse 1 |
| IL | - | Interleucina |
| IL1R1 | - | Receptor do tipo I de interleucina 1 |
| IL1R2 | - | Receptor do tipo II de interleucina 1 |
| IR3535 | - | Butilacetilaminopropionato de etila |
| IRR | - | Instituto René Rachou |
| JEV | - | <i>Japanese Encephalitis Virus</i> – Vírus da Encefalite Japonesa |
| LIPC | - | Lipase hepática |
| LPS | - | Lipopolissacarídeo |
| M | - | Proteína da membrana viral |
| MAPK | - | Proteína quinase ativada por mitógenos |
| Me(a). | - | Mestre(a) |
| MPO | - | Mieloperoxidase |
| NB3 | - | Nível de biossegurança 3 |

| | | |
|--------------------|---|---|
| NETs | - | <i>Neutrophil extracellular traps</i> – armadilhas extracelulares dos neutrófilos |
| NFKB1 | - | Fator nuclear-kappa-B 1 |
| NK | - | <i>Natural killers</i> – Células exterminadoras naturais |
| NLR | - | <i>NOD-like receptor</i> – Receptor do tipo NOD |
| nm | - | Nanômetro |
| NS | - | Proteínas não estruturais virais |
| OMS | - | Organização Mundial da Saúde |
| ORF | - | <i>Open reading frame</i> – Fase de leitura aberta |
| PAMPs | - | <i>Pathogen-associated molecular pattern</i> – Padrões moleculares associados a patógenos |
| pb | - | Pares de base |
| PCA | - | <i>Principal component analysis</i> – Análise de componente principal |
| PCR | - | <i>Polymerase Chain Reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase |
| PKR | - | Proteína quinase dependente de RNA |
| POWV | - | <i>Powassan Virus</i> – Vírus Powassan |
| prM | - | Proteína precursora da membrana viral |
| PRNT | - | <i>Plaque Reduction Neutralization Tests</i> – Teste de neutralização por redução de placa |
| PRRs | - | <i>Pattern Recognition Receptors</i> – Receptores de reconhecimento de padrões |
| qPCR | - | <i>Quantitative polymerase chain reaction</i> ou <i>Real time polymerase chain reaction</i> – Reação em cadeia da polimerase quantitativa ou Reação em cadeia da polimerase em tempo real |
| RIN | - | <i>RNA integrity number</i> – Número de Integridade de RNA |
| RLR | - | <i>RIG-like receptor</i> – Receptor do tipo RIG |
| RNA | - | <i>Ribonucleic Acid</i> – Ácido Ribonucleico |
| ROMO1 | - | Modulador de espécies reativas de oxigênio 1 |
| ROS | - | Espécies reativas de oxigênio |
| RT-qPCR | - | <i>Reverse transcription quantitative polymerase chain reaction</i> – Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa |
| SARS-CoV-2- | | <i>Severe acute respiratory syndrome coronavirus 2</i> – Coronavírus 2 da síndrome respiratória aguda grave |

| | | |
|-----------------|---|---|
| SNP | - | <i>Single nucleotide polymorphism</i> – Polimorfismo de nucleotídeo único |
| ssRNA | - | <i>Positive-sense single-stranded RNA</i> – RNA fita simples e polaridade positiva |
| TBEV | - | <i>Tick-borne Encephalitis Virus</i> – Vírus da Encefalite transmitida por carrapatos |
| TBP | - | Gene da proteína de ligação a TATA- <i>box</i> |
| TGFB3 | - | Gene do fator de transformação de crescimento beta-3 |
| TLR | - | <i>Toll-like receptor</i> – Receptor do tipo <i>Toll</i> |
| TNF | - | <i>Tumor necrosis factor</i> – Fator de necrose tumoral |
| TNFRSF1A | - | Membro 1A da superfamília do receptor de TNF |
| TNFSF10 | - | Membro 10 da superfamília de TNF |
| UTI | - | Unidade de Terapia Intensiva |
| W | - | Watt |
| WNV | - | <i>West Nile Virus</i> – Vírus do Nilo Ocidental |
| YFV | - | <i>Yellow Fever Virus</i> – Vírus da Febre Amarela |
| ZIKV | - | <i>Zika Virus</i> – Vírus Zika |
| µL | - | Microlitro |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 18 |
| 1.1 Família <i>Flaviviridae</i> | 18 |
| 1.1.1 Gênero <i>Flavivirus</i> | 20 |
| 1.1.2 Vírus da febre amarela | 21 |
| 1.2 Febre amarela | 21 |
| 1.2.1 Epidemiologia | 21 |
| 1.2.2 Transmissão | 23 |
| 1.2.3 Manifestações clínicas | 24 |
| 1.2.4 Resposta imune contra o vírus da febre amarela | 24 |
| 1.2.5 Diagnóstico | 27 |
| 1.2.5.1 Diagnóstico sorológico | 27 |
| 1.2.5.1.1 Teste de neutralização por redução de placas – PRNT | 27 |
| 1.2.5.1.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática – ELISA | 28 |
| 1.2.5.2 Diagnóstico molecular | 28 |
| 1.2.5.3 Diagnóstico histopatológico | 29 |
| 1.2.6 Tratamento | 29 |
| 1.2.7 Profilaxia | 30 |
| 1.2.7.1 Vacinação | 32 |
| 1.3 Surto de febre amarela (2016-2020) | 33 |
| 1.4 Hepatite de recidiva tardia | 34 |
| 2 JUSTIFICATIVA | 37 |
| 3 OBJETIVO GERAL | 39 |
| 3.1 Objetivos específicos | 39 |
| 4 METODOLOGIA | 40 |
| 4.1 Padronização dos ensaios | 40 |
| 4.1.1 Obtenção de amostras | 40 |
| 4.1.1.1 Amostra processada por <i>Cell strainer</i> | 40 |
| 4.1.1.2 Amostras de fragmento de coágulo | 40 |
| 4.1.2 Extração de RNA | 41 |
| 4.1.2.1 Extração de RNA de amostra processada por <i>Cell strainer</i> | 41 |

| | |
|---|-----|
| 4.1.2.2 Extrações de RNA de amostras de fragmento de coágulo..... | 41 |
| 4.1.2.2.1 Extrações de RNA utilizando TRIzol™ Reagent em contato com o fragmento de coágulo..... | 41 |
| 4.1.2.2.2 Extração de RNA com sonicador..... | 42 |
| 4.1.2.2.3 Extração de RNA com bisturi e maceração com pistilo..... | 42 |
| 4.1.2.2.4 Extração de RNA com congelamento por nitrogênio e maceração com pistilo..... | 42 |
| 4.1.2.3 Tratamento de RNA com DNase..... | 43 |
| 4.1.2.4 Análises de integridade dos RNAs..... | 43 |
| 4.1.3 Síntese de cDNA..... | 43 |
| 4.1.3.1 Análises de amplificação dos cDNAs provenientes dos RNAs extraídos e processados das diferentes formas..... | 44 |
| 4.1.4 Extrações de DNA..... | 44 |
| 4.1.4.1 Extração de DNA pelo método TRIzol™ Reagent..... | 44 |
| 4.1.4.2 Extração de DNA com kit QIAamp® DNA Blood Mini..... | 45 |
| 4.1.4.3 Extração de DNA com tampão BEB..... | 46 |
| 4.1.4.4 Extração de DNA com NucleoSpin® Tissue XS Kit..... | 46 |
| 4.1.4.5 Extração de DNA com Wizard® Genomic DNA Purification Kit..... | 47 |
| 4.2 População de estudo – surto de 2017-2018..... | 47 |
| 4.3 Seleção do painel de genes..... | 48 |
| 4.4 Extração de RNA e DNA..... | 48 |
| 4.5 Síntese de cDNA..... | 49 |
| 4.6 Ensaios TaqMan® Array Cards..... | 50 |
| 4.7 Análises de expressão..... | 50 |
| 4.8 Análises estatísticas..... | 51 |
| 5 RESULTADOS E DISCUSSÃO..... | 52 |
| 5.1 Padronização dos métodos de extração de RNA e DNA das amostras de coágulo conservadas em TRIzol™ Reagent..... | 52 |
| 5.2 Seleção de um painel de genes..... | 57 |
| 5.3 Análise das amostras – surto de 2017-2018..... | 59 |
| 6 CONCLUSÃO..... | 98 |
| 7 PERSPECTIVAS..... | 99 |
| 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 100 |

1 INTRODUÇÃO

Os arbovírus são vírus que possuem parte da sua multiplicação ocorrendo em artrópodes e que são transmitidos por eles durante sua alimentação, infectando humanos e outros animais e podendo causar doenças (RUST, 2012).

Algumas arboviroses causadas por vírus da família *Flaviviridae* são doenças emergentes de grande importância médica no Brasil e em outros países. Um dos fatores que favorecem essa situação é que os mosquitos vetores das doenças, em especial *Aedes aegypti*, estão distribuídos por todo o globo, principalmente em regiões tropicais e subtropicais (MACKENZIE *et al.*, 2004; BROWN *et al.*, 2014).

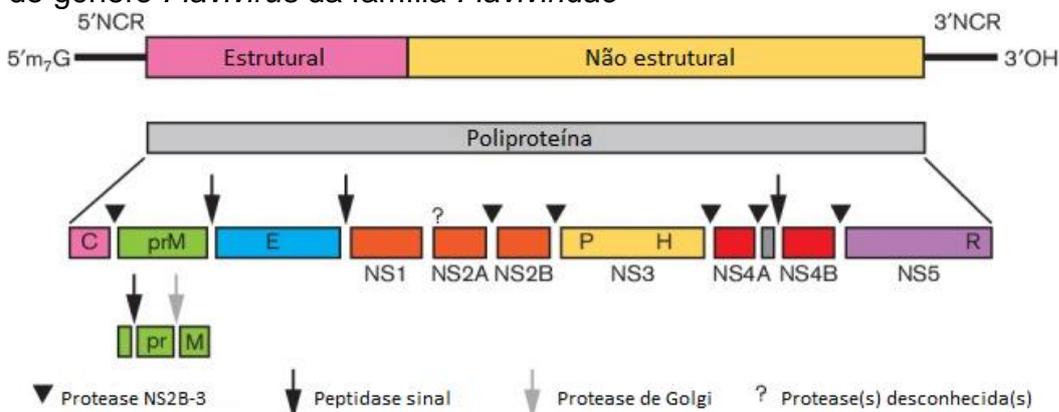
1.1 Família *Flaviviridae*

Os vírus da família *Flaviviridae* são vírus envelopados, de ácido ribonucleico (RNA) de polaridade positiva, linear e de cadeia simples. Possuem formato esférico com diâmetro aproximado de 50 nm (LINDENBACH *et al.*, 2001).

Estes vírus possuem uma única fase de leitura aberta (*Open reading frame* - ORF) flanqueada por regiões 5'- e 3'-terminais não codificantes, responsáveis pela formação de estruturas secundárias para replicação e tradução do genoma viral (SIMMONDS *et al.*, 2017).

O genoma da maioria dos vírus dessa família codifica uma poliproteína precursora de dez proteínas envolvidas nas etapas de replicação viral (Figura 1), sendo três proteínas estruturais: E (envelope), C (capsídeo) e prM (precursora da membrana); e sete não estruturais (NS): NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B, NS5 (WONG *et al.*, 2019).

Figura 1 – Esquema da organização e processamento do genoma viral de membros do gênero *Flavivirus* da família *Flaviviridae*



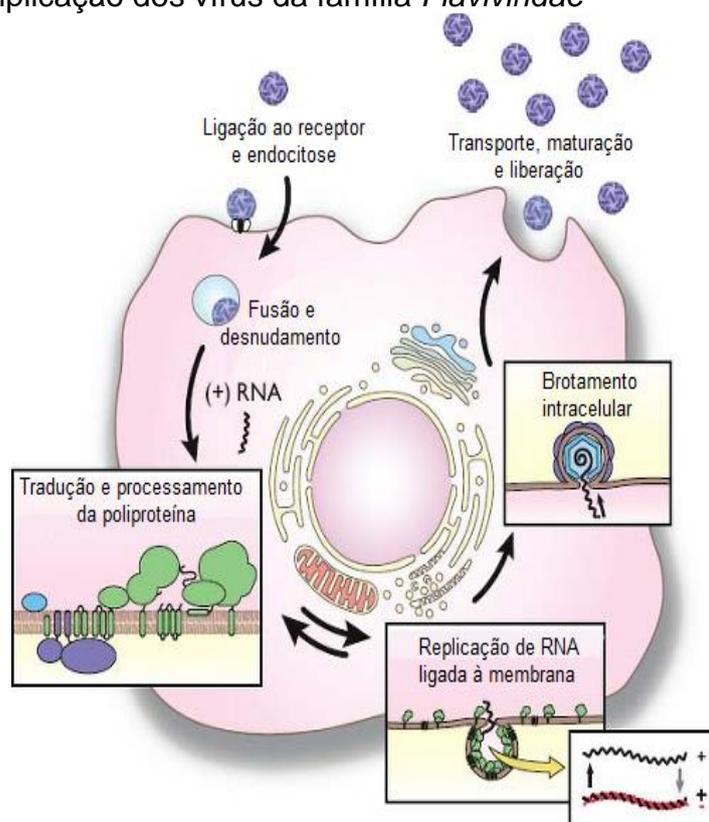
No topo está representado o genoma viral que codifica proteínas estruturais e não estruturais, e que é flanqueado por regiões não codificantes (3'- e 5'-NCR). Caixas abaixo da representação do genoma indicam proteínas geradas por processamento da poliproteína. C indica proteína do capsídeo; prM indica proteína precursora de membrana, que dá origem à pr (proteína precursora) e à M (proteína de membrana); E indica proteína do envelope; NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 indicam proteínas não estruturais; P, H e R indicam domínios protease de NS3, RNA helicase de NS3 e RNA polimerase dependente de RNA de NS5, respectivamente. Fonte: Adaptado de SIMMONDS *et al.* (2017).

Os vírus dessa família são internalizados pela célula hospedeira por endocitose mediada por receptores, e migram em endossomos iniciais para o interior da célula. Nos endossomos ocorre a fusão das membranas celular e viral e a liberação do genoma viral no citoplasma celular (desnudamento), induzidas por acidificação do meio (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

Após o desnudamento ocorre a tradução e o processamento da poliproteína viral por proteínas humanas e virais. Um complexo de replicação é formado, a partir de membranas intracelulares, e transcreve o RNA fita positiva (RNA+) em RNA fita negativa (RNA-), que servirá de molde para nova síntese de RNA+ (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009).

Na superfície do retículo endoplasmático as partículas infecciosas virais (vírions) imaturas são montadas e ocorre o brotamento delas, que migram para o complexo Golgi através da rede trans-Golgi. No complexo Golgi ocorre a clivagem de prM em pr e M (proteína da membrana viral) mediada por furina, gerando vírions maduros, que são liberados da célula hospedeira por meio de exocitose (FERNANDEZ-GARCIA *et al.*, 2009) (Figura 2).

Figura 2 – Multiplicação dos vírus da família *Flaviviridae*



O vírus penetra a célula hospedeira por endocitose mediada por receptores e migra em direção ao citoplasma por endossomos, onde ocorre fusão e desnudamento por acidificação do meio. Após desnudamento ocorre a tradução e processamento da poliproteína viral e formação do complexo de replicação de RNA. O brotamento das partículas virais montadas ocorre na superfície do retículo endoplasmático, e elas migram para o complexo Golgi, onde sofrem maturação e são liberadas por exocitose. Fonte: Adaptado de LINDENBACH *et al.* (2001).

A família *Flaviviridae* é subdividida em quatro gêneros: (i) *Pestivirus*, que é composto por vírus que infectam suínos e ruminantes, como bois e ovelhas, e podem causar infecções assintomáticas ou doenças intestinais e hemorrágicas; (ii) *Hepacivirus*, composto por vírus que infectam primatas e outros mamíferos, e podem causar danos e doenças hepáticas; (iii) *Pegivirus*, com vírus que infectam várias espécies de mamíferos, e causam infecção, porém sem associação à doença até o momento; e (iv) *Flavivirus*, composto por vírus que infectam mamíferos e aves, e podem causar infecções assintomáticas ou febres hemorrágicas e doenças neurológicas (SIMMONDS *et al.*, 2017).

1.1.1 Gênero *Flavivirus*

O gênero *Flavivirus* é composto por mais de 50 espécies, sendo grande parte causadora de doenças em humanos e transmitidas por mosquitos e carrapatos, podendo gerar febre, encefalite e febres hemorrágicas (LINDENBACH *et al.*, 2001).

Alguns membros desse gênero que causam doenças economicamente importantes, consideradas ameaças mundiais à saúde humana e animal, são o vírus da Febre Amarela (YFV), Dengue vírus (DENV), vírus da Encefalite Japonesa (JEV), vírus do Nilo Ocidental (WNV) e vírus da Encefalite transmitida por carrapatos (TBEV) (RUST, 2012; SIMMONDS *et al.*, 2017).

1.1.2 Vírus da febre amarela

O vírus da febre amarela foi isolado pela primeira vez em 1927 na África Ocidental e foi o modelo de estudo da família *Flaviviridae*, rendendo-lhe esse nome, uma vez que *flavus* é amarelo em latim (STROKES *et al.*, 1928; GARDNER & RYMAN, 2010; WAGGONER *et al.*, 2018).

Até o momento foram identificados sete genótipos do YFV, sendo cinco africanos e dois sul-americanos: (i) África Ocidental I; (ii) África Ocidental II; (iii) África Oriental e Central; (iv) África Oriental; (v) genótipo Angola; (vi) América do Sul I; e (vii) América do Sul II (MUTEBI & BARRETT, 2002; BARRETT & MONATH, 2003; VON LINDERN *et al.*, 2006; STOCK *et al.*, 2012).

1.2 Febre amarela

1.2.1 Epidemiologia

A febre amarela é uma doença hemorrágica, causada por um arbovírus do gênero *Flavivirus* e transmitida por mosquitos dos gêneros *Aedes*, *Sabethes* e *Haemagogus* (CDC, 2019a; OPAS, 2019).

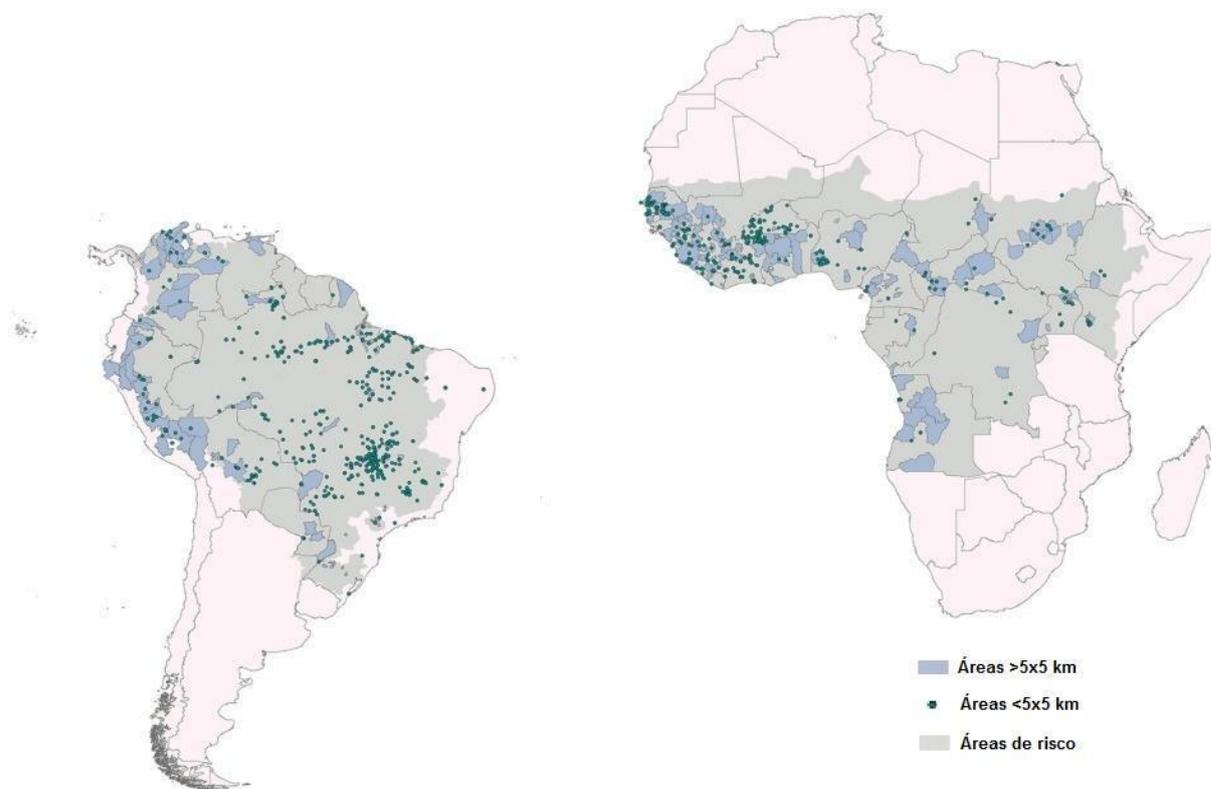
Ela foi reportada pela primeira vez em 1648 em Yucatán, México, mas evidências históricas indicam que o vírus e os mosquitos vetores da doença são originários do continente africano (HINDLE, 1932; WONG *et al.*, 2019).

A doença possui esse nome devido à icterícia e febre que afetam algumas pessoas infectadas, e é responsável por mais de 30.000 mortes anuais no mundo (WHO, 2018; WHO, 2019a).

Mais de 40 países da África, América Central e América do Sul são endêmicos ou possuem regiões endêmicas para febre amarela (Figura 3), e cerca de 200 mil casos ocorrem anualmente no mundo. Porém, estima-se que o número real de casos seja de dez a 250 vezes maior do que é notificado, uma vez que muitos infectados são assintomáticos, o que contribui para a disseminação da doença e para sua

subnotificação (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2015; WHO, 2019a).

Figura 3 – Ocorrência de febre amarela no mundo (1970-2016)



Representação de casos de febre amarela no mundo, de 1970 a 2016. Os pontos indicam casos em locais com área menor que 5 km². Regiões azuis indicam casos em locais com área maior que 5 km². Regiões verdes indicam áreas de risco. Fonte: Adaptado de SHEARER *et al.* (2018).

No Brasil, o período sazonal de casos da doença é entre dezembro e maio, uma vez que neste período as condições climáticas favorecem o aumento das populações de mosquitos transmissores (CAVALCANTE & TAUIL, 2016; WHO, 2019b).

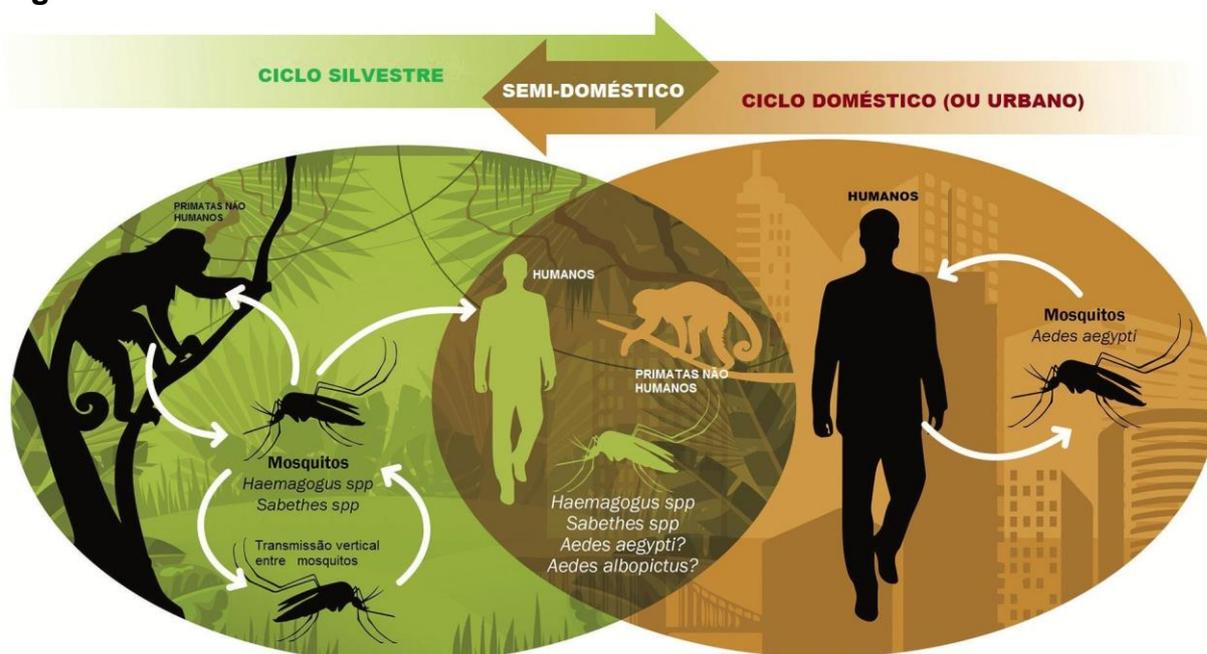
Até 2007, a febre amarela era endêmica somente na região amazônica, porém a migração de pessoas infectadas dessa região para grandes centros urbanos favoreceu o aparecimento da doença em áreas antes não endêmicas, afetando principalmente as regiões Sudeste e Sul do país (ROMANO *et al.*, 2011).

A febre amarela também afeta primatas não humanos, que são considerados sentinelas e usados desde 2000 na vigilância epidemiológica no Brasil, com a identificação do vírus e, principalmente, mortalidade dos animais, para detecção precoce da circulação e transmissão viral (ROMANO *et al.*, 2011; CAVALCANTE & TAUIL, 2016; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

1.2.2 Transmissão

A transmissão da febre amarela pode ocorrer em três tipos de ciclos: (i) silvestre, no qual os principais reservatórios da doença são primatas não humanos, e a infecção em humanos, normalmente trabalhadores rurais ou viajantes, ocorre de forma ocasional; (ii) semi-doméstico, no qual os mosquitos fêmeas *Haemagogus* spp. infectam humanos e primatas não humanos, sendo o tipo mais comum na África; e (iii) doméstico, no qual os mosquitos fêmeas, principalmente *A. aegypti*, infectam humanos em áreas urbanas densamente povoadas (Figura 4) (WHO, 2019a).

Figura 4 - Ciclos de transmissão da febre amarela



Representação dos três ciclos de transmissão da febre amarela. No ciclo silvestre a manutenção do vírus ocorre em primatas não humanos e vetores *Haemagogus* spp. e *Sabethes* spp. No ciclo semi-doméstico, humanos e primatas não humanos são infectados pela picada de *Haemagogus* spp., *Sabethes* spp., *Aedes aegypti* ou *Aedes albopictus*. No ciclo doméstico (ou urbano), humanos são infectados pela picada de *A. aegypti*. Fonte: Adaptado de POSSAS *et al.* (2018).

Para que ocorra a transmissão, o vírus precisa superar barreiras imunológicas e físicas do mosquito, se replicar e migrar para as glândulas salivares. Depois que o mosquito se alimenta de sangue de um vertebrado infectado, o vírus se liga a receptores das células intestinais do artrópode e se replica no intestino médio (BOSIO *et al.*, 2000; ALONSO-PALOMARES *et al.*, 2019).

Os vírions produzidos após a replicação viral se acumulam na lâmina basal do intestino médio que, durante o repasto com sangue, tem o tamanho dos seus poros aumentados devido à expansão do tecido intestinal e à hidrólise de colágeno IV. O

intestino dos mosquitos sofre alterações estruturais e permite a passagem das partículas virais que infectam e se replicam em diversos outros tecidos e nas células das glândulas salivares (BOSIO *et al.*, 2000; DONG *et al.*, 2017).

As células das glândulas salivares secretam a saliva, juntamente com as partículas virais, que entram em contato com o hospedeiro vertebrado durante repasto sanguíneo da fêmea do mosquito, dando continuidade ao ciclo de transmissão da doença (ALONSO-PALOMARES *et al.*, 2019).

1.2.3 Manifestações clínicas

Sabe-se que a maioria das pessoas infectadas são assintomáticas, porém os pacientes sintomáticos podem apresentar febre, cefaleia, dor muscular, náusea, vômito e icterícia. O período de incubação varia de três a seis dias, podendo se estender até de dez a 15 dias. Cerca de 15% dos indivíduos que contraem o vírus da febre amarela apresentam sintomas graves. A taxa de letalidade da febre amarela grave é de 30 a 60% (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a; CDC, 2019b).

Além das manifestações clínicas, as alterações laboratoriais nos permitem classificar as formas da doença em cada paciente e manejá-lo clinicamente da melhor forma possível (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

Na febre amarela leve e moderada há diminuição de plaquetas, leve aumento de transaminases e níveis normais ou pouco elevados de bilirrubinas (principalmente a bilirrubina direta). Na febre amarela grave há diminuição intensa de plaquetas, elevação de creatinina e considerável aumento de transaminases. Enquanto na febre amarela maligna, além das alterações presentes na forma grave, há também coagulação intravascular disseminada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

1.2.4 Resposta imune contra o vírus da febre amarela

O sistema imunológico é um complexo de células e componentes moleculares responsáveis por defender o organismo de patógenos e outros danos. É dividido em dois grandes grupos: (i) imunidade inata, composta de células *Natural Killers* (NK), macrófagos, neutrófilos, monócitos, basófilos, mastócitos e eosinófilos, bem como proteínas do sistema complemento e de fase aguda, e citocinas, e é ativada toda vez que antígenos são reconhecidos; e (ii) imunidade adaptativa, composta de linfócitos T e B, e imunoglobulinas (anticorpos), e é responsável por uma resposta

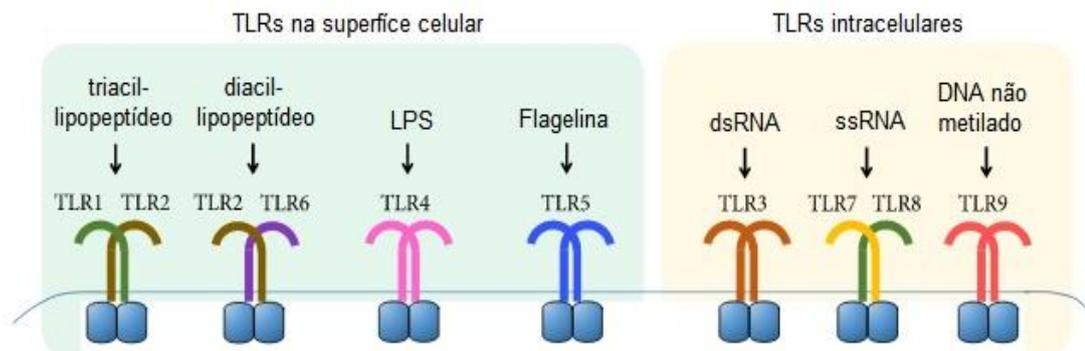
mais especializada após exposição repetida a determinado antígeno (DELVES & ROITT, 2000).

O sistema interferon, composto por interferons do tipo I (interferons alfa e beta), do tipo II (interferon gama) e do tipo III (quatro tipos de interferon lambda), é o primeiro mecanismo de defesa antiviral do sistema imunológico inato (NGONO & SHRESTA, 2018).

Os interferons do tipo I podem ser produzidos por qualquer célula nucleada após reconhecimento do antígeno por receptores de reconhecimento de padrões (PRRs), que podem ser do tipo NOD (NLR), tipo RIG (RLR) e do tipo *Toll* (TLR), e estão envolvidos, em conjunto com proteínas quinases e genes dependentes de interferon do tipo I, no processamento de RNA e viabilidade celular, afetando diretamente a replicação viral nas células do hospedeiro (NGONO & SHRESTA, 2018; VIDYA *et al.*, 2018).

Os TLRs (Figura 5) são capazes de reconhecer padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) e padrões moleculares associados a danos (DAMPs), e podem ser expressos na superfície das células (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5, TLR-6, TLR-11 e TLR-12) ou em seus endossomos (TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9). Estão envolvidos na indução da expressão de genes que desencadeiam respostas da imunidade inata e nos processos de produção de anticorpos específicos da imunidade adquirida (VIDYA *et al.*, 2018).

Figura 5 – Receptores *Toll-like* humanos e seus ligantes



Representação dos receptores do tipo *Toll* (TLRs) da superfície celular (TLR-1, TLR-2, TLR-4, TLR-5 e TLR-6) e intracelulares (TLR-3, TLR-7, TLR-8 e TLR-9), e seus ligantes. TLR-1 e TLR-2 reconhecem triacil-lipopeptídeos; TLR-2 e TLR-6 reconhecem diacil-lipopeptídeos; TLR-4 reconhece lipopolissacarídeo (LPS) bacteriano; TLR-5 reconhece flagelina; TLR-3 reconhece RNA dupla fita (dsRNA); TLR-7 e TLR-8 reconhecem RNA de cadeia simples e polaridade positiva (ssRNA) de vírus; e TLR-9 reconhece DNA não metilado. Fonte: Adaptado de NOH *et al.* (2020).

As partículas virais induzem a produção de citocinas mediadas por TLRs (TLR-2, TLR-7, TLR-8 e TLR-9), como interleucinas (IL-1 β , IL-4, IL-6, IL-10 e IL-12), fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), e outras, que são responsáveis por inibir a replicação viral, recrutar e ativar células da imunidade inata (WATSON & KLIMSTRA, 2017).

Em caso de avanço da replicação viral, há ativação de linfócitos T citotóxicos (T CD8⁺), que expressam diferentes marcadores, se diferenciam em várias populações de memória, e linfócitos T auxiliares (T CD4⁺), que expressam receptor de quimiocina c-x-c tipo 5 (CXCR5) e produzem IL-4, envolvidas na produção de linfócitos B e imunoglobulinas G1 (IgG1) (WATSON & KLIMSTRA, 2017).

Os anticorpos, produzidos pelos linfócitos B, são elementos de proteção mais duradoura e específica. Porém, quando não há suficiente neutralização viral por anticorpos, os níveis de citocinas pró-inflamatórias se elevam na tentativa de contenção dos vírus, e o indivíduo infectado apresenta caso mais grave da doença (WATSON & KLIMSTRA, 2017).

Durante o curso da doença, há infiltrado de linfócitos T (CD4⁺ e CD8⁺), linfócitos B, macrófagos, células NK e células apresentadoras de antígenos (APCs) no fígado do indivíduo infectado. Esse infiltrado acarreta aumento de citocinas e anticorpos neutralizantes, que causam apoptose, esteatose e necrose lítica dos hepatócitos (WATSON & KLIMSTRA, 2017).

1.2.5 Diagnóstico

A febre amarela pode ser diagnosticada clinicamente quando o caso suspeito apresentar quadro febril agudo; residir ou ter visitado área de surto ou rural/silvestre e quando apresentar os demais sintomas da doença (alguns ou todos) por dois ou mais dias. Porém a doença se assemelha a outras infecções virais, febres hemorrágicas, flaviviruses, como dengue, e outras doenças, como malária, e por isso depende de diagnóstico específico (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a; OPAS, 2019).

O diagnóstico específico pode ser realizado por meio da identificação de anticorpos no sangue dos indivíduos infectados, teste de neutralização por redução de placa (PRNT) ou ensaio de imunoabsorção enzimática (ELISA), ou em seus tecidos pode ser feita a imuno-histoquímica. Ainda é possível a detecção do vírus no sangue ou tecidos (isolamento viral); identificação de lesões características da doença em tecidos (histopatologia); e por detecção do material genético do vírus no sangue ou urina, por transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase quantitativa (RT-qPCR), porém, apesar de ser bem sensível, este último possui baixa taxa de detecção em casos de baixa carga viral, e deve ser realizado somente na fase inicial da doença (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a; OPAS, 2019).

1.2.5.1 Diagnóstico sorológico

1.2.5.1.1 Teste de neutralização por redução de placas - PRNT

O PRNT foi desenvolvido por Russel e Nisalak em 1967. O teste consiste em cultivar células de primatas não humanos em placas que são expostas aos vírus em diferentes concentrações e ao soro do paciente, e incubadas (RUSSEL & NISALAK, 1967; RUSSEL *et al.*, 1967; THOMAS *et al.*, 2009).

Os poços são, então, corados e observa-se a formação de placas de destruição celular causadas pelos vírus ou, quando há pouca ou nenhuma placa, indica que a formação destas foi evitada pela presença de anticorpos neutralizantes no soro do paciente analisado (THOMAS *et al.*, 2009).

Devido a falta de padronização de linhagens celulares, linhagens virais, entre outros, a reprodutibilidade do teste em diferentes laboratórios se torna quase impossível. Outra dificuldade na realização desse teste é a necessidade de manusear alguns

agentes biológicos, incluindo vírus da família *Flaviviridae* (como POWV e TBEV), em laboratórios de nível de biossegurança 3 (NB3). Porém esse método diagnóstico é eficiente, recomendado e utilizado até hoje (THOMAS *et al.*, 2009; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a).

1.2.5.1.2 Ensaio de imunoabsorção enzimática - ELISA

Os imunoenaios são bons métodos de diagnóstico devido ao alto nível de sensibilidade e à capacidade de testar várias amostras ao mesmo tempo, além de não serem necessários uma estrutura laboratorial diferenciada e equipamentos caros para realização destes (YOLKEN, 1980).

Em placas de plástico com 96 poços são adicionadas proteínas virais (para detecção de anticorpos contra vírus) ou anticorpos de captura (para detecção de proteínas virais nas amostras biológicas), seguida de adição da amostra a ser testada e adição de anticorpo secundário ligado a uma enzima. Caso haja ligação, indicando positividade para anticorpos contra o vírus ou presença de proteínas virais, a enzima converte um substrato em emissão de cor (YOLKEN, 1980).

Esse ensaio também possui limitações, como a necessidade de anticorpos específicos para impedir ligações inespecíficas (YOLKEN, 1980).

1.2.5.2 Diagnóstico molecular

Os métodos moleculares baseados em reação de cadeia da polimerase (PCR) permitem a detecção do genoma viral e sua quantificação, são bastante rápidos, sensíveis e específicos, devido ao uso de iniciadores e sondas específicas (RATCLIFF *et al.*, 2007).

O diagnóstico molecular consiste em extrair o RNA viral das amostras dos pacientes, mantendo sua integridade, com auxílio de reagentes e kits de extração. Utiliza-se primers e sondas, que são escolhidos por anelarem nas regiões conservadas dos genomas dos vírus (RATCLIFF *et al.*, 2007).

As amostras são desnaturadas e as sondas e iniciadores, que são complementares às regiões a serem amplificadas, se ligam em determinadas temperaturas a essas regiões que servem de molde para formação de novas sequências alvo. As extensões são novamente desnaturadas, servem de molde para a síntese de novas moléculas e o processo é repetido continuamente (MULLIS & FALOONA, 1987).

A etapa de transcrição reversa (RT) é necessária para o diagnóstico de vírus de RNA por permitir sua detecção de forma mais fácil, uma vez que o ácido desoxirribonucleico complementar (cDNA) é sintetizado a partir do RNA e, assim, a DNA polimerase pode realizar a amplificação das regiões alvo (WRIGHT & WYNFORD-THOMAS, 1990; RATCLIFF *et al.*, 2007).

Em uma PCR, normalmente são realizados de 25 a 40 ciclos de amplificação e o material genético pode ser amplificado em mais de dez milhões de vezes. As moléculas produzidas são separadas por eletroforese em géis com corantes fluorescentes ou são identificadas por fluorescência das sondas em softwares, e são comparadas às amostras controles, com presença e ausência de vírus, para realização do diagnóstico (BELÁK *et al.*, 1989; RATCLIFF *et al.*, 2007).

Apesar de eficaz, esse método necessita de reagentes específicos, como sondas e iniciadores, amostras controle, extração do material genético e armazenamento adequado de amostras, além de equipamentos específicos de alto custo (RATCLIFF *et al.*, 2007).

1.2.5.3 Diagnóstico histopatológico

O exame histopatológico consiste na visualização dos tecidos acometidos por determinado agente etiológico, para identificar o agente e lesões características ou novas causadas por ele, estabelecendo diagnóstico quando a realização de cultura não for possível ou der resultado negativo (WATTS & CHANDLER, 1995).

A técnica é invasiva, principalmente em pacientes com danos hepáticos; pode ser inespecífica, em casos de microrganismos diferentes que causam danos semelhantes; e necessita de profissional muito qualificado para realizá-la. Porém é uma alternativa quando não há tecido fresco disponível para cultura e pode ser essencial para o diagnóstico, principalmente quando associada aos métodos moleculares (WATTS & CHANDLER, 1995).

1.2.6 Tratamento

Não existem, até o momento, antivirais eficazes, específicos e disponíveis para tratar a febre amarela. Portanto, estudos com anticorpos com capacidade de neutralizar o vírus estão sendo realizados, além de tratamentos à base de interferon e imunomoduladores, que apresentam eficácia, porém somente antes ou logo após o

estabelecimento da infecção (MONATH *et al.*, 2008; LU *et al.*, 2019).

Além disso, no ano de 2018 iniciou-se um tratamento *off label* com o medicamento sofosbuvir como medida emergencial em pacientes em estado crítico. O sofosbuvir é um medicamento aprovado pela agência reguladora de remédios dos Estados Unidos da América (*Food and Drug Administration*, FDA), e utilizado para o tratamento de pacientes infectados com o vírus da Hepatite C (HCV). Esse medicamento apresentou atividade antiviral *in vitro* e *in vivo* contra o vírus da febre amarela e outros flavivírus, inibindo a replicação viral em células humanas em cultura e protegendo os camundongos tratados da mortalidade, perda de peso e lesão hepática quando comparados aos camundongos não tratados. Entretanto, esse medicamento apresenta custo extremamente elevado e pouca disponibilidade, inviabilizando sua utilização como tratamento (BROCK, 2018, comunicação pessoal; FREITAS *et al.*, 2019).

Sendo assim, o manejo dos pacientes baseia-se na melhoria das manifestações clínicas, como desidratação, insuficiência hepática e renal, e febre. Antibióticos também são utilizados para tratar infecções bacterianas associadas (WHO, 2019a).

Os casos graves devem ser atendidos em Unidade de Terapia Intensiva (UTI) e deve-se sempre evitar medicamentos salicilatos, como ácido acetilsalicílico ou aspirina, que podem induzir manifestações hemorrágicas nos pacientes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a).

1.2.7 Profilaxia

Os fatores que causam grande impacto no número de casos de febre amarela são: (i) aumento da população de mosquitos; (ii) aumento de residentes em áreas de circulação de mosquitos (urbanização descontrolada); (iii) aumento da mobilidade das pessoas, que favorece a migração do vírus para áreas, até então, não endêmicas; e (iv) mudanças climáticas, que favorecem a proliferação dos mosquitos. Portanto, medidas de profilaxia são de extrema importância para diminuir a disseminação da febre amarela (ROMANO *et al.*, 2011; REZZA *et al.*, 2016; CAVALCANTE & TAUIL, 2016).

Medidas de controle de arboviroses, principalmente a dengue, são realizadas de forma contínua pelo Ministério da Saúde, como atuação de programas de prevenção e combate ao mosquito (*A. aegypti*), desenvolvimento de campanha de informações

sobre as doenças e mobilização das pessoas, fortalecimento de vigilância epidemiológica, fomento destinado ao descarte correto de resíduos sólidos e armazenamento de água de vários setores, entre outros (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Também é incentivada a vigilância da população em suas próprias casas para que se evite o acúmulo de água em recipientes abertos dentro de casa e em quintais (CDC, 2019c; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

É recomendado o uso de proteções individuais, principalmente em áreas endêmicas, para impedir ou dificultar a picada de mosquitos, como uso de camisas de manga comprida e calças longas, instalação de telas nas janelas e portas das casas, e uso de redes mosquiteiras em camas e berços para dormir (CDC, 2019c; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Outro método de controle consiste na utilização de repelentes de insetos para afastar mosquitos adultos, desde que aprovados pela Agência Nacional de Vigilância Sanitária (Anvisa). Os princípios ativos mais utilizados nos repelentes comercializados no Brasil são N,N-dietil-3-metilbenzamida (DEET), icaridina, butilacetilaminopropionato de etila (IR3535) e óleo de citronela (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020b).

Ainda, os mosquitos depositam seus ovos em recipientes com água parada, por isso um método de controle é aplicar larvicida nesses recipientes. *Bacillus thuringiensis* são bactérias que produzem toxinas Crystal (Cry), responsáveis por lisar as células epiteliais do intestino médio dos mosquitos e, por isso, são usadas em larvicidas e inseticidas (BRAVO *et al.*, 2007; PRUSZYNSKI *et al.*, 2017; OPAS, 2019).

Foi identificada, em 2010, uma subespécie de *B. thuringiensis*, a LLP29, que é muito tóxica para mosquitos, sendo utilizada para controle de mosquitos e doenças transmitidas por eles. Entretanto, foi visto que os mosquitos e larvas que sobrevivem após exposição a *B. thuringiensis* tiveram um desenvolvimento mais rápido e reproduziram mais, comparado aos mosquitos e larvas não expostos (ZHANG *et al.*, 2010; ALTO & LORD, 2016).

Estudos realizados demonstram que *Wolbachia*, proteobactérias alfa, intracelulares obrigatórias, que infectam grande parte dos artrópodes e nematóides, são capazes de aumentar a resistência de insetos a vírus de RNA e que não há reprodução

eficiente entre insetos machos colonizados por *Wolbachia* e fêmeas não colonizadas (YEN & BARR, 1973; WERREN *et al.*, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2008).

O uso de mosquitos colonizados com *Wolbachia* reduziu em 77% os casos de infecções sintomáticas por DENV e em 86% os casos de hospitalizações, em estudo realizado em Yogyakarta, Indonésia (UTARINI *et al.*, 2021).

1.2.7.1 Vacinação

Devido à falha nas estratégias de controle de vetores, como resistência vetorial aos inseticidas, e à indisponibilidade de antivirais para tratamento da doença, a vacinação é um dos pilares da saúde pública para o controle da febre amarela (COLLINS *et al.*, 2017; BATOOL *et al.*, 2018; LU *et al.*, 2019).

Uma vacina segura contra febre amarela está disponível há mais de 80 anos, porém em alguns países a cobertura vacinal é baixa devido a problemas sociais, econômicos e de dificuldade de acesso à população, uma vez que as áreas mais endêmicas são as silvestres (CDC, 2020; MONATH, 2001).

A vacina, no Brasil, é disponibilizada gratuitamente e durante todo o ano pelo Sistema Único de Saúde (SUS), e é desenvolvida a partir do vírus vivo atenuado (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) recomenda a introdução da vacina contra febre amarela nos programas de imunização em todos os países endêmicos, e para evitar a transmissão da doença é importante que mais de 80% da população em risco seja vacinada, bem como viajantes em áreas de risco (WHO, 2019a).

A vacina não é recomendada para crianças com menos de 9 meses de idade e mulheres grávidas, exceto em caso de surto; alérgicos à proteína do ovo; idosos com mais de 60 anos e pessoas com imunodeficiência grave ou distúrbio do timo, por haver relatos de efeitos colaterais graves nesses indivíduos, como danos hepáticos, renais e no sistema nervoso central (WHO, 2019a).

A OMS determina a aplicação de uma única dose da vacina que seria capaz de induzir proteção por toda a vida, porém alguns estudos demonstram declínio de proteção dependente do tempo por redução de anticorpos ou células de memória TCD8⁺ de cinco a dez anos após a vacinação primária, sugerindo a importância de doses de reforço a cada dez anos, principalmente para residentes em áreas

endêmicas e viajantes (COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES, 2014; CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2016; WHO, 2018; CAMPI-AZEVEDO *et al.*, 2019).

1.3 Surto de febre amarela (2016-2020)

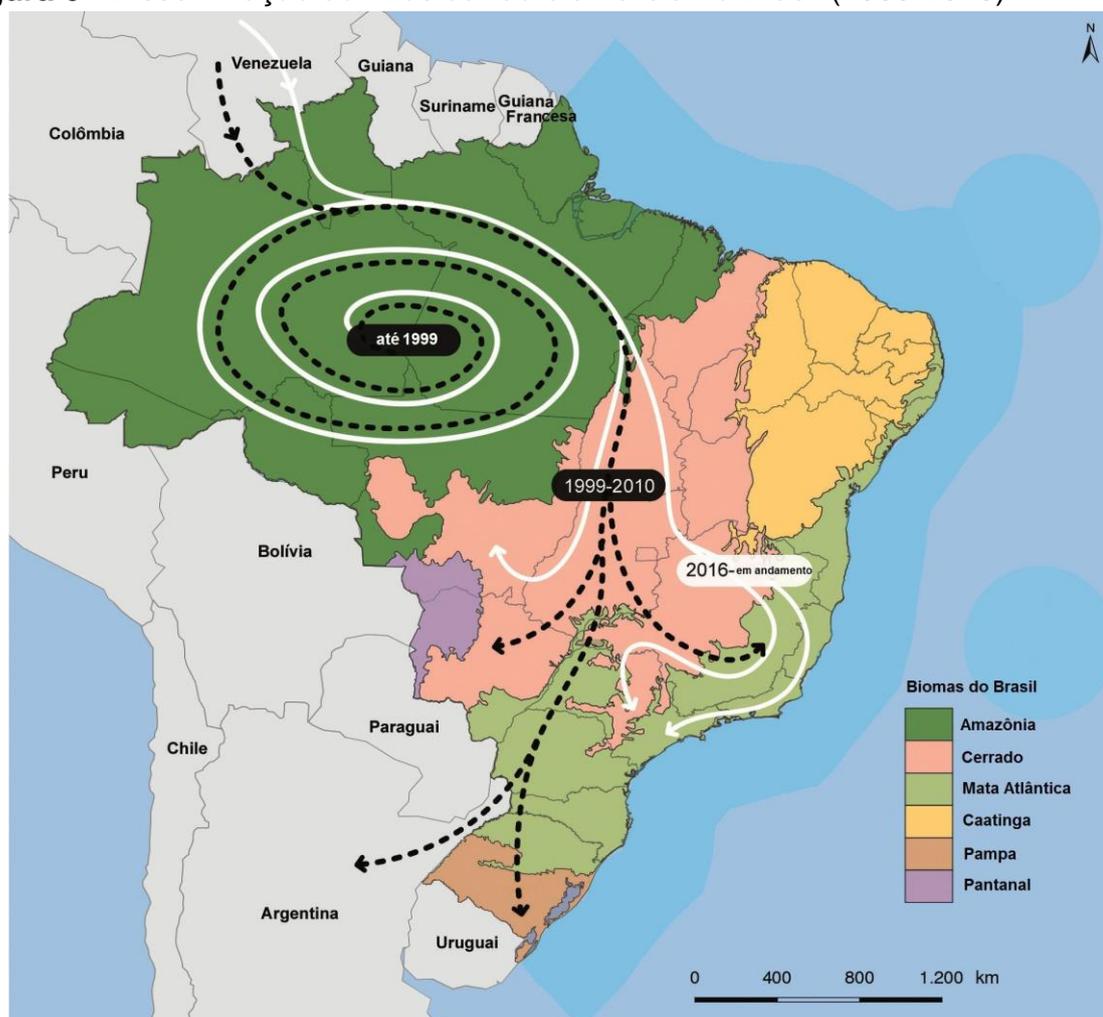
Em 2015-2016 foram registradas epizootias e casos humanos isolados em Goiás, Minas Gerais e São Paulo, indicando aumento da área de circulação do vírus. Falhas em estratégias epidemiológicas e políticas, como controle e vacinação, foram responsáveis pelo aumento do número de casos da doença no país (POSSAS *et al.*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a).

Em 2016-2017 houve um surto da doença, acometendo, principalmente, os estados de Minas Gerais, Espírito Santo, São Paulo e Rio de Janeiro com 779 casos humanos, dentre eles, 262 óbitos. A maioria dos casos confirmados era do sexo masculino (86%), em idade laboral (30 a 60 anos), não vacinados contra febre amarela e residentes em áreas rurais (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; GOLDANI, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b).

Desde novembro de 2017, a Secretaria de Vigilância em Saúde realiza o monitoramento da febre amarela com a publicação de atualizações semanais dos casos humanos e epizootias notificados no país. Porém, mesmo com a intensificação da vigilância, em 2017-2018, ocorreu novo surto da doença, com 1.376 casos humanos e 483 óbitos. O vírus atingiu a costa leste do Brasil na região de Mata Atlântica (Figura 6), causando preocupação pela presença de grande diversidade de primatas não humanos e de potenciais vetores da febre amarela. A transmissão da doença durante esses dois surtos (2016-2017 e 2017-2018) ocorreu em ciclo silvestre, e os últimos casos de transmissão urbana da febre amarela no Brasil ocorreram em 1942 (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018b; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020a).

Os dois surtos (2016-2017 e 2017-2018) foram causados pelo YFV do genótipo América do Sul I, linhagem 1E, e transmitidos por *Haemagogus janthinomys* e *Haemagogus leucocelaenus* (SILVA *et al.*, 2020).

Figura 6 - Disseminação do vírus da febre amarela no Brasil (1980-2016)



Representação da disseminação do vírus da febre amarela pelos diferentes biomas brasileiros. As setas com linhas pretas tracejadas indicam o deslocamento do vírus de 1980 a 2010. As setas brancas indicam o deslocamento do vírus desde o último semestre de 2010, incluindo os surtos de 2016-2017 e 2017-2018. Fonte: Adaptado de Possas *et al.*, 2018.

Em 2018-2019 foram confirmados 36 casos humanos em São Paulo e Paraná, bem como 13 epizootias em São Paulo e uma no Paraná. Os casos humanos e epizootias no estado do Paraná chamaram a atenção por se tratar de um estado populoso, com fronteira internacional e sem casos confirmados de febre amarela desde 2015. Portanto, campanhas e políticas de imunização contra febre amarela foram realizadas no Sul do país em 2019 (WHO, 2019b).

No Brasil, em 2019-2020, foram identificados 327 casos humanos suspeitos, sendo um confirmado e com óbito, e 1.087 epizootias suspeitas, sendo 300 descartadas e 38 confirmadas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020c).

1.4 Hepatite de recidiva tardia

De janeiro a maio de 2018, foram relatados casos de 12 viajantes que retornavam do

Brasil para seus países (Holanda, França, Romênia, Suíça, Alemanha, Argentina e Chile) e apresentaram hepatite ou insuficiência renal e hepática, após serem infectados pelo vírus da febre amarela, que resultaram em quatro óbitos. Eles visitaram os estados do Rio de Janeiro, Minas Gerais e São Paulo, e não foram previamente vacinados contra febre amarela (HAMER *et al.*, 2018; OLIOSI *et al.*, 2018; DENIS *et al.*, 2019).

Foram identificados, após entrada hospitalar, níveis elevados de enzimas hepáticas, bilirrubinas, e creatinina, em alguns indivíduos, bem como diminuição de plaquetas e detecção do vírus da febre amarela nas amostras desses indivíduos. Após algumas semanas houve reversão desse quadro clínico e os pacientes receberam alta hospitalar. Entretanto, cerca de dois meses após início dos sintomas, dois pacientes que retornaram para a França apresentaram novamente elevação de enzimas hepáticas, que persistiu por até sete meses, porém sem detecção do RNA viral nas amostras. A hepatite tardia relacionada à febre amarela foi identificada pela primeira vez em 1969, na Nigéria, por meio de biópsias hepáticas, que indicaram danos até dois meses após a infecção (FRANCIS *et al.*, 1972).

Posteriormente, foi atribuída, inicialmente, ao sistema imune do hospedeiro, uma vez que esses pacientes apresentaram anticorpos capazes de neutralizar 100% das partículas virais em ensaios de PRNT, não fizeram uso de medicações hepatotóxicas, não apresentaram anticorpos autoimunes e não estavam coinfectedados (DENIS *et al.*, 2019).

A hepatite de recidiva tardia também foi identificada e relatada em estudos nacionais. Rezende e colaboradores (2020) relatam o caso de um paciente de 51 anos que apresentava febre amarela, residente em Minas Gerais, e que procurou atendimento médico em janeiro de 2017, quatro dias após início dos sintomas. Foi observado aumento nos níveis de ALT, AST, bilirrubinas, fosfatase alcalina, gama-glutamilttransferase e ureia, bem como diminuição de plaquetas e leucócitos. O paciente apresentou melhora do quadro no 14º dia, porém voltou a apresentar aumento nos níveis de enzimas hepáticas no 36º dia.

No 64º dia, o paciente ainda apresentava níveis elevados de AST, ALT e bilirrubinas, porém sem detecção do RNA viral nas amostras de sangue e urina. Também não foram identificados marcadores para hepatite autoimune. Posteriormente, o paciente

foi submetido a uma biópsia hepática, que indicou infiltrado mononuclear portal e lobular. Foram realizados ensaios com fragmentos da biópsia, identificando a presença de RNA viral de YFV e antígenos de YFV (REZENDE *et al.*, 2020).

O paciente também apresentou níveis elevados de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias como IL-1, TNF- α , IFN- γ , CCL3 e CXCL10; citocina reguladora IL-10 e fatores de crescimento como IL-7 e GM-CSF; bem como níveis baixos de CCL2, IL-15, IL-2, entre outros. Após o 306º dia, o paciente apresentou melhora clínica e foi dispensado do retorno ambulatorial (REZENDE *et al.*, 2020).

Também foi relatado o caso de um paciente de 42 anos, residente em Minas Gerais, que procurou atendimento médico quatro dias após início de mal-estar e febre alta. Foi observado aumento dos níveis das enzimas hepáticas, e, após dois dias, aumento de bilirrubinas e diminuição de plaquetas. Após uma semana o paciente apresentou melhora do quadro e recebeu alta, porém apresentou aumento de bilirrubinas e ALT no 40º dia (OSÓRIO *et al.*, 2020).

Foram realizadas buscas por anticorpos, não identificando marcadores para hepatite autoimune, e biópsia hepática, indicando presença de infiltrado neutrofílico leve sem a presença de RNA viral de YFV. Após cinco dias foi visto que a YF-PCR realizada no período da primeira internação foi positiva. Duas semanas depois, o paciente apresentou melhora do quadro clínico e recebeu alta (OSÓRIO *et al.*, 2020).

Portanto, a hepatite de recidiva tardia em pacientes com febre amarela é caracterizada pela elevação de aminotransferases, predominantemente de ALT, após melhora clínica e laboratorial do paciente, entre 40 e 70 dias após os sintomas iniciais. Algumas pessoas também apresentam icterícia, mesmo não tendo apresentado no período inicial da doença. Ela afeta aproximadamente 16% dos pacientes com febre amarela que foram hospitalizados (DENIS *et al.*, 2019; REZENDE *et al.*, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d; OSÓRIO *et al.*, 2020).

O ressurgimento dos sintomas hepáticos e a presença de vírus no fígado confirmada por biópsia indicam que a hepatite de recidiva tardia pode ser causada por reação inflamatória tardia do indivíduo. A maioria dos pacientes que apresentaram hepatite tardia evoluiu para melhora clínica e laboratorial cerca de 120 dias após identificação da hepatite, sem necessidade de uso de medicações (DENIS *et al.*, 2019; REZENDE *et al.*, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d; OSÓRIO *et al.*, 2020).

2 JUSTIFICATIVA

Sabe-se que aproximadamente 15% dos pacientes que contraem o vírus da febre amarela apresentam sintomas graves e, desses, 30-60% evoluem para óbito. Ainda não há um tratamento específico para febre amarela, tornando o manejo dos pacientes extremamente difícil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a; CDC, 2019b; WHO, 2019a).

Recentemente, no surto de 2017-2018, cerca de 16% dos pacientes considerados curados apresentaram hepatite de recidiva tardia, de três a quatro meses após início dos sintomas. Biópsias indicaram presença do vírus no fígado, além de danos às células hepáticas (REZENDE *et al.*, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d; OSÓRIO *et al.*, 2020).

Análises de biomarcadores séricos de pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia indicaram aumento de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias e de fatores de crescimento (REZENDE *et al.*, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d).

Ainda existem diversas lacunas no conhecimento sobre a febre amarela, principalmente relacionado à hepatite de recidiva tardia. Os estudos mais detalhados acerca da resposta imune e evolução dessa doença tão antiga só ocorreram, recentemente, após os surtos de 2016-2018. A existência de uma vacina eficaz, fez com que quase todo o conhecimento sobre a febre amarela que se adquiriu ao longo dos anos se restringisse às respostas vacinais.

Diante disso, a análise de assinaturas gênicas de pacientes curados e pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia pode permitir a seleção de marcadores para o prognóstico da doença. Assim, propomos a utilização de PCR em tempo real com painéis customizados para a análise dos níveis de expressão de genes envolvidos em eventos hemorrágicos e nas funções de imunidade inata, inflamassomas e apoptose. Propomos, também, a análise da expressão de genes relacionados às vias de sinalização de receptores de IL-1 e receptores tipo *Toll*, envolvidos na detecção de agentes patogênicos, genes envolvidos no reconhecimento de produtos imunogênicos e no processo de ativação da coagulação, além de genes que auxiliam a determinar os mecanismos de morte celular programada e a propensão à apoptose.

A análise comparativa da expressão dos genes contidos nestes painéis pode levar à

seleção de uma assinatura de expressão gênica que sirva como instrumento preditivo de prognóstico da febre amarela, permitindo um melhor manejo dos pacientes.

3 OBJETIVO GERAL

Avaliar perfis de expressão gênica para identificação de biomarcadores de prognóstico de hepatite de recidiva tardia em pacientes com febre amarela.

3.1 Objetivos específicos

- Estabelecer métodos para extração de RNA e DNA das amostras de coágulos de pacientes;
- Selecionar um painel de genes contendo possíveis marcadores relacionados ao desfecho clínico de recidiva tardia da febre amarela;
- Verificar o perfil de expressão dos genes selecionados em pacientes curados e em pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, nos estágios iniciais, após a fase aguda, e na fase de recidiva da doença;
- Correlacionar os perfis de expressão gênica com o prognóstico da doença.

4 METODOLOGIA

4.1 Padronização dos ensaios

4.1.1 Obtenção de amostras

Foram obtidas amostras de sangue, provenientes de voluntários saudáveis, para a padronização dos métodos de extração de RNA e de DNA, e síntese de cDNA.

As amostras de sangue foram coletadas em tubos de 5 mL contendo gel separador, e mantidas neles até o momento da coagulação sanguínea. A seguir os coágulos foram processados por *Cell strainer* ou como fragmentos de coágulo, ambas amostras foram armazenadas em TRIzol™ Reagent (Invitrogen) à -80 °C.

4.1.1.1 Amostra processada por *Cell strainer*

A amostra de coágulo sanguíneo foi centrifugada a 700 x g por 10 minutos a 20 °C. O soro foi descartado e o coágulo foi cortado em fragmentos de aproximadamente 1 grama, com o apoio de pinças, bisturis e placas de Petri estéreis e livres de RNase. O fragmento de coágulo foi inserido em *Cell strainer*, acoplado a um tubo de 50 mL, e macerado com êmbolo de seringa estéril. A rede de *Cell strainer* foi lavada com aproximadamente 7 mL de meio RPMI-1640.

O excesso de meio RPMI foi descartado e 250 µL da amostra foram transferidos para microtubo de 1,5 mL, devidamente identificado, e adicionados a 1 mL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen). A amostra foi armazenada a -80 °C para posterior extração de RNA.

4.1.1.2 Amostras de fragmento de coágulo

As amostras de coágulos sanguíneos foram centrifugadas a 700 x g por 10 minutos a 20 °C. Os soros foram descartados e os coágulos foram cortados em fragmentos de aproximadamente 1 grama, com o apoio de pinças, bisturis e placas de Petri estéreis e livres de RNase. Os fragmentos de coágulos foram inseridos em microtubos de 1,5 mL, devidamente identificados, e foi adicionado 1 mL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen). As amostras foram armazenadas a -80 °C para posterior extração do RNA.

4.1.2 Extração de RNA

4.1.2.1 Extração de RNA de amostra processada por *Cell strainer*

A amostra foi descongelada em gelo. A seguir, 200 µL de clorofórmio foram acrescentados e a amostra foi agitada em vórtex por 15 segundos, ficando 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada a 15.294 x g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa foi transferida para um novo microtubo. A fase orgânica foi armazenada a -80 °C para posterior extração de DNA. Foram adicionados 500 µL de isopropanol e 10 µg de glicogênio e a amostra foi incubada *overnight* a -20 °C.

No dia seguinte a amostra foi descongelada a 4 °C, centrifugada a 15.294 x g por 10 minutos nesta temperatura, e o sobrenadante descartado com pipeta. Foi adicionado 1 mL de etanol 75% na amostra, que foi agitada em vórtex por 15 segundos. A amostra foi centrifugada a 5.974 x g por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante descartado com pipeta. O microtubo foi vertido por 10 minutos para completa evaporação do etanol e a amostra foi ressuspensa com 20 µL de água livre de nucleases. A amostra foi incubada por 10 minutos a 56 °C e por 1 hora a 4 °C.

4.1.2.2 Extrações de RNA de amostras de fragmento de coágulo

Independente da forma de processamento dos fragmentos de coágulo, o RNA total foi extraído utilizando o método do TRIzol™ Reagent (Invitrogen), como descrito a seguir (item 4.1.2.2.1).

4.1.2.2.1 Extrações de RNA utilizando TRIzol™ Reagent em contato com o fragmento de coágulo

As amostras tiveram seus coágulos retirados dos tubos, e estes foram armazenados em microtubos contendo 500 µL de TRIzol™ Reagent (Invitrogen), para uso em outros ensaios.

Utilizando o TRIzol™ que esteve em contato direto com os coágulos, foram acrescentados 200 µL de clorofórmio e as amostras agitadas em vórtex por 15 segundos, ficando 3 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, as amostras foram centrifugadas a 15.294 x g por 15 minutos a 4 °C e a fase aquosa transferida para um novo tubo. A fase orgânica foi armazenada a -80 °C para posterior extração de DNA. Foram adicionados 500 µL isopropanol e 10 µg de glicogênio e as amostras

foram incubadas *overnight* a $-20\text{ }^{\circ}\text{C}$. No dia seguinte, as amostras foram descongeladas a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, centrifugadas a 15.294 x g por 10 minutos nesta temperatura, e o sobrenadante descartado com pipeta. Foi adicionado 1 mL de etanol 75% nas amostras, que foram agitadas em vórtex por 15 segundos.

A seguir, as amostras foram centrifugadas a 5.974 x g por 5 minutos a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$, e os sobrenadantes descartados com pipeta. Os microtubos foram vertidos por 10 minutos para completa evaporação do etanol e as amostras foram ressuspensas com 20 μL de água livre de nucleases. As amostras foram incubadas por 10 minutos a $56\text{ }^{\circ}\text{C}$ e por 1 hora a $4\text{ }^{\circ}\text{C}$.

4.1.2.2.2 Extração de RNA com sonicator

Para fragmentação dos coágulos, as amostras foram inseridas em tubos de 15 mL e submetidas às ondas sonoras, com auxílio de um sonicator do Laboratório Multiusuário de Produção de Recombinantes do Instituto René Rachou (IRR), por 10 segundos a 750 W de potência, com amplitude de 30%.

O RNA dessas amostras foi extraído utilizando o método do TRIzol™ Reagent (Invitrogen), como descrito anteriormente (item 4.1.2.2.1).

4.1.2.2.3 Extração de RNA com bisturi e maceração com pistilo

Os coágulos foram retirados dos tubos e cortados em fragmentos, com auxílio de placas de Petri e bisturis estéreis. Os fragmentos foram inseridos em microtubos de 1,5 mL e macerados com pistilos autoclavados.

O RNA dessas amostras foi extraído utilizando o método do TRIzol™ Reagent (Invitrogen), como descrito anteriormente (item 4.1.2.2.1).

4.1.2.2.4 Extração de RNA com congelamento por nitrogênio e maceração com pistilo

Os coágulos foram retirados dos tubos, inseridos em cadinhos de porcelana previamente tratados com dietilpirocarbonato (DEPC) e autoclavados, e congelados com nitrogênio líquido. Posteriormente, foram macerados com pistilos de porcelana tratados com DEPC e autoclavados e inseridos em microtubos de 1,5 mL.

O RNA dessas amostras foi extraído utilizando o método do TRIzol™ Reagent (Invitrogen), como descrito anteriormente (item 4.1.2.2.1).

4.1.2.3 Tratamento de RNA com DNase

Em todos os protocolos de extração de RNA testados, o RNA obtido foi imediatamente tratado com DNase – TURBO DNA-free™ (Ambion), seguindo o protocolo do fabricante.

Foram adicionados 2,2 µL de 10X TURBO DNase Buffer e 1 µL de TURBO DNase nas amostras de RNA. Após gentil agitação, as amostras foram incubadas a 37 °C por 30 minutos. Foi adicionado mais 1 µL de TURBO DNase nas amostras, e elas foram novamente incubadas a 37 °C por 30 minutos.

Após a segunda incubação, foram adicionados 4,8 µL de DNase Inactivation Reagent. As amostras foram gentilmente agitadas, incubadas por 5 minutos em temperatura ambiente e centrifugadas a 10.000 x g por 1,5 minutos. Após o tratamento, os RNAs foram retirados, com auxílio de pipeta, e transferidos para novos microtubos.

4.1.2.4 Análises de integridade dos RNAs

Os RNAs tratados foram quantificados utilizando o kit Qubit™ RNA High Sensitivity (Invitrogen), com auxílio do Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen), analisados quanto à integridade, no sistema Bioanalyzer (Agilent, *software* versão 2.6) e no Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen), seguindo as orientações dos fabricantes, e armazenados a -80 °C para posterior síntese de cDNA.

4.1.3 Síntese de cDNA

Para a síntese de cDNA foram testados três diferentes sistemas, que utilizam Random primers e Oligo(dT)s, seguindo as orientações do fabricante, e utilizando para cada reação 200 ng de RNA de uma amostra processada por *Cell strainer*.

- Illustra™ Ready-To-Go™ PCR Beads (GE Healthcare);
- ImProm-II™ Reverse Transcriptase (Promega);
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific).

Após a síntese, foram realizadas reações de PCR em tempo real quantitativa com 1 µL de cada cDNA, 5 µL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 3,5 µL de água livre de nucleases e 0,5 µL de iniciadores e sonda específicos para GAPDH (20 X) (Hs02758991_g1, Thermo Fisher Scientific).

As reações foram realizadas em duplicata no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), da Plataforma de PCR em tempo real do IRR, em três etapas. A primeira etapa consistiu em um ciclo de 50 °C por 2 minutos; a segunda em um ciclo de 95 °C por 10 minutos; e a terceira em 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Os resultados foram analisados no sistema QuantStudio® Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, *software* versão 1.3).

4.1.3.1 Análises de amplificação dos cDNAs provenientes dos RNAs extraídos e processados das diferentes formas

Após a padronização, foi utilizado o sistema High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) e inibidor de ribonuclease RNasin® (Promega), seguindo as orientações dos fabricantes, para síntese de cDNA das amostras de RNA extraídas das diferentes formas. Foram realizadas reações de PCR em tempo real quantitativa como descrito anteriormente (item 4.1.3).

4.1.4 Extrações de DNA

As fases orgânicas das amostras utilizadas nas extrações de RNA das amostras processadas por *Cell strainer* e daquelas utilizando o TRIzol™ Reagent em contato com os fragmentos de coágulos, e armazenadas a -80 °C foram posteriormente utilizadas em cinco diferentes testes de extrações de DNA.

4.1.4.1 Extração de DNA pelo método TRIzol™ Reagent

Os DNAs foram extraídos utilizando o método do TRIzol™ Reagent (Invitrogen). Anterior à etapa de precipitação do DNA foi adicionada uma etapa de digestão do coágulo sanguíneo, com a finalidade de extrair maior quantidade de material genético.

Foram adicionados 500 µL de etanol 70% nas amostras, que foram centrifugadas a 2.000 x g por 5 minutos a 4 °C. Depois foram adicionados 400 µL de tampão SNET, composto de 1% de dodecil sulfato de sódio, 400 nM de cloreto de sódio, 5 mM de ácido etilenodiamino tetra-acético com pH 8,0, e 20 mM de Tris-(hidroximetil)-aminometano, com pH 8,0, diluído em ácido clorídrico; e 4 µL de proteinase K, e as amostras foram incubadas *overnight* a 50 °C.

As demais etapas foram realizadas conforme orientações do fabricante. As amostras

de DNA foram ressuspensas em 100 µL de água livre de nucleases, quantificadas utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) e armazenadas a -20 °C para utilização em ensaios de PCR.

Para a verificação da integridade dos DNAs, reações de PCR foram realizadas utilizando o kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), sendo 2 µL de DNA; 0,1 µL de Platinum® Taq DNA Polymerase; 0,2 µL de dNTP (10 mM); 1 µL de 10X PCR Buffer,-Mg; 0,3 µL de MgCl₂ (50 nM); 6,4µL de água livre de nucleases; e 0,5 µL de cada iniciador (10 µM) específico para amplificar o éxon 7 do gene endógeno ABO (419 pb), gentilmente cedidos por Dra. Taís Nóbrega de Sousa e Me. Gabriel Luiz Costa (OLSSON *et al.*, 1998).

As reações foram realizadas em termociclador em quatro etapas: desnaturação inicial a 96 °C por 8 minutos; 10 ciclos de 94 °C por 20 segundos e 69 °C por 1 minuto; 25 ciclos de 94 °C por 20 segundos e 64 °C por 30 segundos; e extensão final a 72 °C por 1 minuto. Os produtos amplificados foram analisados em géis de agarose 1% corados com brometo de etídio (VOYTAS, 2001).

4.1.4.2 Extração de DNA com kit QIAamp® DNA Blood Mini

Os DNAs de quatro amostras foram extraídos utilizando o kit QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen), segundo orientações do fabricante, ressuspensos em 50 µL de água livre de nucleases, quantificados utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) e armazenados a -20 °C para posterior ensaios de PCR e reação em cadeia da polimerase quantitativa (qPCR).

Duas amostras foram utilizadas em reações de PCR com kit Platinum® Taq DNA Polymerase (Invitrogen), conforme descrito para as amostras extraídas pelo método de TRIzol™ Reagent (Invitrogen) (item 4.1.4.1).

As outras duas amostras foram utilizadas em reações de PCR em tempo real quantitativa, com 2 µL de cada DNA, 5 µL de Power SYBR® Green PCR Master Mix (Applied Biosystems), 2 µL de água livre de nucleases e 0,5 µL de cada iniciador (10 µM) específico para amplificar o éxon 7 do gene do grupo sanguíneo ABO (419 pb).

As reações foram processadas no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), da Plataforma de PCR em tempo real do IRR, em três etapas: um ciclo de 95 °C por 5 minutos; 40 ciclos de 95 °C por 30 segundos, 68 °C por 30

segundos e 72 °C por 1 minuto; e um ciclo de 95 °C por 15 segundos. Ao final, foi realizada a curva de dissociação para verificar a especificidade dos primers.

Os resultados foram analisados no sistema QuantStudio® Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, *software* versão 1.3).

4.1.4.3 Extração de DNA com tampão BEB

As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 5 minutos a 4 °C, e o sobrenadante descartado. Foram adicionados 5 mL de tampão BEB (do inglês, *Back Extraction Buffer*), composto de 4 M de tiocianato de guanidina, 50 mM de citrato de sódio e 1 M de Tris-(hidroximetil)-aminometano, na fase orgânica das amostras.

As amostras foram agitadas vigorosamente por 3 minutos e centrifugadas 12.000 x g por 30 minutos em temperatura ambiente. Os sobrenadantes foram retirados e armazenados em outros tubos.

As fases orgânicas das amostras foram incubadas por 5 minutos em 400 µL de isopropanol, centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes foram descartados.

Foram adicionados 500 µL de etanol 70% nas amostras, que foram agitadas por inversão por 15 segundos. As amostras foram centrifugadas a 12.000 x g por 15 minutos a 4 °C, e os sobrenadantes descartados com pipeta.

Os DNAs foram ressuspensos em 30 µL de água livre de nucleases, quantificados utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) e armazenados a -20 °C para posterior ensaio de qPCR para amplificar o éxon 7 do gene do ABO (419 pb), conforme descrito anteriormente (item 4.1.4.2).

4.1.4.4 Extração de DNA com NucleoSpin® Tissue XS Kit

Os DNAs foram extraídos utilizando NucleoSpin® Tissue XS Kit (Macherey-Nagel), segundo orientações do fabricante, ressuspensos em 20 µL de água livre de nucleases, quantificados utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) e armazenados a -20 °C para posterior ensaio de qPCR para amplificar o éxon 7 do gene do ABO (419 pb), conforme descrito anteriormente (item 4.1.4.2).

4.1.4.5 Extração de DNA com Wizard® Genomic DNA Purification Kit

Os DNAs foram extraídos utilizando Wizard® Genomic DNA Purification Kit (Promega), segundo orientações do fabricante, ressuspensos em 30 µL de água livre de nucleases, quantificados utilizando o Qubit 4 Fluorometer (Invitrogen) e armazenados a -20 °C para posterior ensaio de qPCR para amplificar o éxon 7 do gene do ABO (419 pb), conforme descrito anteriormente (item 4.1.4.2).

4.2 População de estudo – surto de 2017-2018

Foi realizado um estudo do tipo observacional, em parceria com o Hospital Eduardo de Menezes, durante o surto de 2017-2018. As amostras de coágulo sanguíneo dos pacientes recrutados foram gentilmente cedidas pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores do IRR, com a colaboração da Dra. Andréa Teixeira de Carvalho e da Ma. Jordana Rodrigues Barbosa Fradico. Também foram cedidas amostras de pacientes que tiveram febre amarela e foram curados (grupo controle), as quais foram selecionadas de forma a minimizar possíveis fatores de confusão, como sexo e idade dos pacientes. O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética para pesquisa envolvendo seres humanos do IRR (CAAE 29456320.2.0000.5091, aprovação nº 3.893.849/2020, CAAE # 72569317.2.0000.5091 e CAAE 82357718.5.0000.5091). Os participantes ou representantes legalmente autorizados leram e assinaram o termo de consentimento informado antes da inserção na presente investigação.

Foram selecionadas amostras de coágulo de três tempos após início dos sintomas:

- Estágio inicial após a fase aguda: de 07 a 15 dias após início dos sintomas;
- Estágio tardio após a fase aguda: de 16 a 35 dias após início dos sintomas;
- Estágio de recidiva da doença: de 61 a 90 dias após início dos sintomas.

As amostras foram divididas em seis grupos, denominados como descrito a seguir:

- FA 07-15d: pacientes efetivamente curados, de 07 a 15 dias após início dos sintomas;
- FA 16-35d: pacientes efetivamente curados, de 16 a 35 dias após início dos sintomas;
- FA 61-90d: pacientes efetivamente curados, de 61 a 90 dias após início dos sintomas;

- Hep 07-15d: pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, de 07 a 15 dias após início dos sintomas;
- Hep 16-35d: pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, de 16 a 35 dias após início dos sintomas;
- Hep 61-90d: pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, de 61 a 90 dias após início dos sintomas.

4.3 Seleção do painel de genes

Foi realizada uma busca na literatura por genes descritos com expressão alterada durante infecções virais, principalmente envolvendo flavivírus. Durante a seleção dos genes, buscamos a complementação das vias avaliadas no trabalho da doutoranda Jordana Fradico, visando uma cobertura mais completa de possíveis biomarcadores alterados. Selecionamos genes relacionados às vias de interferon do tipo I e tipo II, de interleucinas e de receptores tipo *Toll*, genes envolvidos na detecção de agentes patogênicos, no reconhecimento de produtos imunogênicos, no processo de ativação da coagulação, e genes associados aos mecanismos de morte celular programada e a propensão à apoptose.

Foram produzidos ensaios padronizados TaqMan® Array Cards pela empresa Thermo Fisher Scientific, a partir do painel de 48 genes selecionados. Foram priorizados os ensaios que abrangem as junções éxon-éxon dos alvos. Dos 48 genes, quatro foram selecionados para serem utilizados como genes de referência, por apresentarem expressão estável em humanos durante infecções por YFV e/ou outras infecções virais, sendo eles: gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), beta actina (ACTB), proteína de ligação a TATA-box (TBP) e RNA ribossômico 18S (18S) (NYSTRÖM *et al.*, 2004; RADONIĆ *et al.*, 2005; YUE *et al.*, 2010).

4.4 Extração de RNA e DNA

As amostras do surto de 2017-2018 foram processadas pelo Grupo Integrado de Pesquisas em Biomarcadores por *Cell strainer* ou os fragmentos de coágulos foram diretamente armazenados em TRIzol™ Reagent (Invitrogen).

Após os resultados da padronização, as amostras que foram processadas por *Cell strainer* tiveram RNA extraído conforme o protocolo citado em 4.1.2.1, enquanto as amostras de fragmentos de coágulos foram extraídas utilizando somente o TRIzol™

Reagent (Invitrogen) que estava em contato com elas (item 4.1.2.2.1).

As amostras foram imediatamente tratadas com DNase – TURBO DNA-free™ (Ambion), conforme protocolo citado em 4.1.2.

Após a padronização do método de extração de DNA, as amostras do surto de 2017-2018 tiveram DNA extraído conforme o protocolo citado em 4.1.4.2, utilizando QIAamp® DNA Blood Mini Kit (Qiagen), e foram armazenadas a -20 °C para posteriores ensaios de identificação de polimorfismos de nucleotídeo único (SNPs) que possam estar relacionados ao prognóstico de hepatite de recidiva tardia.

4.5 Síntese de cDNA

As amostras de RNA do surto de 2017-2018, com concentração acima de 15 ng/μL, foram utilizadas para a síntese de cDNA com o kit para transcrição reversa High-Capacity cDNA Reverse Transcription (Thermo Fisher Scientific) e inibidor de ribonuclease RNasin® (Promega), seguindo as orientações dos fabricantes, com o volume máximo de 13,2 μL e quantidade de até 2000 ng de RNA total por reação. As amostras de RNA com concentração abaixo de 15 ng/μL foram armazenadas a -80 °C e não foram utilizadas nos demais ensaios.

Antes de serem utilizadas nos ensaios TaqMan® Array Cards (Applied Biosystems), as amostras foram testadas numa reação convencional de qPCR TaqMan™. Foram realizadas reações com amostras de cDNA sintetizadas a partir de 200 ng de RNA, 5 μL de TaqMan® Universal PCR Master Mix (Applied Biosystems), 0,5 μL de iniciadores e sondas específicos para GAPDH (20 X) (Hs02758991_g1, Thermo Fisher Scientific) e água livre de nucleases em volume suficiente para reação de 10 μL, para avaliar se as amostras estavam sendo amplificadas a partir desta quantidade de RNA.

As reações foram processadas no equipamento ViiA™ 7 Real-Time PCR System (Applied Biosystems), da Plataforma de PCR em tempo real do IRR, em três etapas: um ciclo de 50 °C por 2 minutos; um ciclo de 95 °C por 10 minutos; e 40 ciclos de 95 °C por 15 segundos e 60 °C por 1 minuto.

Os resultados foram analisados no sistema QuantStudio® Real-Time PCR Software (Applied Biosystems, *software* versão 1.3).

4.6 Ensaio TaqMan® Array Cards

Foram sintetizados ensaios TaqMan® Array Cards (Applied Biosystems), no formato de 384 poços, contendo sondas e iniciadores específicos, divididos em 8 reservatórios de 48 reações individuais (1 µL cada).

As reações utilizando as amostras do surto de 2017-2018 foram realizadas com 50 µL de cDNA e 50 µL de TaqMan® Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems), inseridos em cada reservatório dos cartões. Os ensaios foram realizados em duplicata.

Devido ao baixo rendimento de RNA na extração de algumas amostras, foram utilizadas amostras de cDNA sintetizadas com diferentes quantidades de RNA, variando de 120 a 400 ng de RNA inicial em cada reservatório dos cartões, sendo 30 amostras de 400 ng, cinco amostras de 250 ng, 42 amostras de 200 ng, duas amostras de 150 ng e uma amostra de 120 ng.

Após adição da mistura de cDNA e master Mix nos reservatórios, os cartões foram centrifugados a 331 x g por 1 minuto, duas vezes seguidas, e depois selados. Os reservatórios foram removidos, seguindo as orientações do fabricante.

As reações foram executadas no equipamento de PCR em tempo real QuantStudio® 12K Flex (Applied Biosystems), da Plataforma de PCR em tempo real do IRR, em duas etapas. A primeira consistiu em um ciclo de 92 °C por 10 minutos; e a segunda em 40 ciclos de 95 °C por 1 segundo e 60 °C por 20 segundos.

Os dados brutos foram analisados na plataforma Thermo Fisher Connect™ (Applied Biosystems), para obtenção dos valores de *Threshold cycle* (Ct) e *Relative threshold cycles* (Crt).

4.7 Análises de expressão

As análises das amostras foram realizadas pelo método de Ct comparativo (Δ Ct) (LIVAK & SCHMITTGEN, 2001), utilizando os valores de Crt normalizados com a utilização da média geométrica dos genes de referência que apresentaram expressão mais estável nas amostras. Para avaliar a variabilidade de expressão dos genes de referência, os valores de Crt obtidos para GAPDH, ACTB e 18S foram avaliados no *software* NormFinder (ANDERSEN *et al.*, 2004). A expressão dos genes selecionados foi determinada usando a quantificação relativa pelo método de

$2^{-\Delta\text{Crt}}$.

Foi realizada a análise de componente principal (PCA) no programa R (versão 4.1.0, 2021-05-18), com os pacotes missMDA (versão 1.18) e PCAtools (versão 2.5.13). Foram utilizados os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ de todos os genes, exceto CCL21, por apresentar dados de expressão em apenas uma amostra.

Foi construído um *heatmap* no programa R (versão 4.1.0, 2021-05-18), com o pacote pheatmap (versão 1.0.12), utilizando os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ de todos os genes.

Também foi realizada análise de assinaturas de biomarcadores, com os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$. Primeiramente foi calculada a mediana global dos valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ para cada gene. Foram consideradas altas respondedoras as amostras que apresentavam valor acima da mediana. As frequências de amostras altas respondedoras em cada grupo experimental foram utilizadas para montar as curvas ascendentes dos biomarcadores no *software* GraphPad Prism 8.0.2 (GraphPad Software, Inc.). As análises foram realizadas utilizando os dados de todos os genes, exceto CCL21.

Também foi realizada a construção de gráfico Upset com os biomarcadores de frequência acima do percentil 50, usando o programa R (versão 4.1.2, 2021-11-01), como pacote UpSetR (versão 1.4.0).

Os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ também foram usados para identificar as vias metabólicas associadas aos perfis de expressão gênica, com o *software* MetaCore™ versão 22.1 build 70800 (GeneGo, Clarivate Analytics). As análises foram realizadas com as medianas dos valores de expressão de cada gene, exceto CCL21, por grupo. O grupo FA 61-90d foi utilizado como referência, sendo atribuído a ele valor de 1, e, a partir dele, foi calculada a expressão dos demais grupos.

4.8 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o teste de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn, ambos realizados no *software* GraphPad Prism 5.03 (GraphPad Software, Inc.). Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Diante das grandes lacunas de conhecimento existentes a respeito da hepatite de recidiva tardia nos surtos recentes e a partir de esforços conjuntos rápidos de médicos e pesquisadores para contornar a situação, foi escrito um manual para o ministério da saúde (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018a; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d) e vários artigos para auxiliar no conhecimento e estabelecimento das diretrizes para o manejo dos pacientes com febre amarela. Diante da emergência de saúde pública, foi feito um esforço enorme para o aproveitamento e caracterização de todas as amostras que pudessem ser coletadas. Assim, foram coletados sangue, urina, saliva e, em casos extremos, biópsia de fígado.

Nesse momento houve uma expansão do conhecimento acerca da doença: (i) o vírus foi identificado na urina de pacientes (BARBOSA *et al.*, 2018); (ii) alguns pacientes entre o período de intoxicação (3 a 8 dias) e o período de convalescença (14 a 28 dias) apresentaram icterícia persistente e progressiva (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d); e (iii) outros pacientes evoluíram para doença grave, porém não apresentaram febre em nenhum momento (LITVOC *et al.*, 2018; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d). Após aproximadamente três meses da alta e suposta cura, surgiram os primeiros relatos de pacientes com hepatite tardia (DENIS *et al.*, 2019; CASADIO *et al.*, 2019; REZENDE *et al.*, 2020; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d; OSÓRIO *et al.*, 2020).

5.1 Padronização dos métodos de extração de RNA e DNA das amostras de coágulo conservadas em TRIzol™ Reagent

As amostras destinadas a este trabalho foram os coágulos que no início foram processados por *Cell strainer*, mas que, posteriormente, foram armazenados em fragmentos em tubos contendo TRIzol™ Reagent. Devido à ausência de protocolos bem estabelecidos, aliada à nossa necessidade de quantidade suficiente de material para analisar o maior número de alvos possíveis, foi necessária uma criteriosa padronização do método de extração de RNA para que pudessemos otimizar a quantidade de RNA recuperada de forma a possibilitar a utilização nos ensaios de qPCR para avaliação de biomarcadores que pudessem indicar a propensão a complicações futuras no quadro de alguns pacientes.

Portanto, foi preciso definir o método que permitiria a extração de quantidade

suficiente de RNA para a realização dos ensaios TaqMan. Para simular o material disponível, sem que houvesse perda de amostras, inicialmente, foram obtidas 30 amostras de sangue de voluntários saudáveis para realização de testes e padronizações. Dessas, 16 foram utilizadas na padronização das extrações de RNA. Para as amostras obtidas que foram armazenadas em TRIzol™ Reagent como fragmentos de coágulo, foi testado o processamento por *Cell strainer*, porém sem êxito, pois o TRIzol™ Reagent que estava em contato com os coágulos dissolvia as redes de *Cell strainer*.

Diante disso, foram buscadas alternativas para fragmentar os coágulos, sendo (i) uso de sonicador, (ii) corte dos fragmentos com bisturi estéril, seguido de maceração com pistilo autoclavado, e (iii) congelamento dos fragmentos com nitrogênio líquido para posterior maceração com pistilo autoclavado.

Uma vez que nenhuma das alternativas permitiu a completa fragmentação dos coágulos, a extração de RNA a partir do TRIzol™ Reagent em contato com os fragmentos também foi testada.

Na tabela 1 estão apresentadas as concentrações (ng/μL) de 16 amostras de RNA processadas e extraídas pelos diferentes métodos descritos na metodologia.

Tabela 1 – Concentrações de RNA nas amostras processadas e extraídas por diferentes métodos

| Método de processamento das amostras | Método de extração utilizado | Identificador da mostra | Concentração (ng/μL) |
|--------------------------------------|---|-------------------------|----------------------|
| <i>Cell strainer</i> | TRIzol™ Reagent | 1 | 39,5 |
| Fragmento de coágulo | Sonicação + TRIzol™ Reagent | 2 | 1.220,0 |
| | | 3 | 84,0 |
| Fragmento de coágulo | Bisturi + maceração + TRIzol™ Reagent | 4 | 454,0 |
| | | 5 | 818,0 |
| Fragmento de coágulo | Congelamento por nitrogênio + maceração + TRIzol™ Reagent | 6 | 4,0 |
| | | 7 | 132,0 |
| | | 8 | 12,0 |
| | | 9 | 184,0 |
| | | 10 | 156,0 |
| Fragmento de coágulo | TRIzol™ Reagent | 11 | 43,1 |
| | | 12 | 27,1 |
| | | 13 | 54,8 |
| | | 14 | 37,8 |
| | | 15 | 40,8 |
| | | 16 | 28,2 |

Fonte: elaborado pela autora.

Análises de integridade por Bioanalyzer (Agilent) fornecem valores de Número de Integridade de RNA (RIN) entre 1,0 (RNA totalmente degradado) e 10,0 (RNA totalmente íntegro). Os RNAs analisados apresentaram RIN entre 1,1 e 5,1, indicando que os métodos de processamento, armazenamento e extração de RNA utilizados degradaram as amostras.

Posteriormente, foi realizada a padronização da síntese de cDNA com a amostra processada por *Cell strainer* (amostra 1) e extraída por TRIzol™ Reagent, utilizando três diferentes kits: Illustra™ (GE Healthcare), ImProm-II™ (Promega) e High-Capacity (Thermo Fisher Scientific). Avaliamos a eficiência de cada um dos protocolos pela amplificação de GAPDH por qPCR. Foram obtidos os seguintes

valores médios de Ct para os cDNAs sintetizados com cada kit:

- Illustra™ Ready-To-Go™ PCR Beads: Ct médio de 23,427;
- ImProm-II™ Reverse Transcriptase: Ct médio de 21,947;
- High-Capacity cDNA Reverse Transcription: Ct médio de 21,134.

Definimos que o melhor kit para transcrição reversa foi o High-Capacity cDNA Reverse Transcription, por amplificar o gene GAPDH mais precocemente que os demais.

Para avaliar a amplificação das amostras que apresentaram degradação, foi realizada a RT-qPCR, utilizando nove amostras de RNA extraídas e processadas de diferentes formas. Na tabela 2 estão apresentadas as médias dos Cts das amplificações de um fragmento do gene GAPDH nas amostras de cDNA.

Tabela 2 – Média dos valores de Cts obtidos pela amplificação de um fragmento do gene GAPDH em nove amostras de cDNAs, provenientes de RNAs extraídos e processados por diferentes métodos

| Método de processamento das amostras | Método de extração utilizado | Identificador da mostra | Amplificação (média de Cts) |
|--------------------------------------|---|-------------------------|-----------------------------|
| <i>Cell strainer</i> | TRizol™ Reagent | 1 | 23,702 |
| Fragmento de coágulo | Sonicação + TRizol™ Reagent | 3 | 35,012 |
| Fragmento de coágulo | Bisturi + maceração + TRizol™ Reagent | 4 | 36,608 |
| Fragmento de coágulo | Congelamento por nitrogênio + maceração + TRizol™ Reagent | 8 | 37,759 |
| Fragmento de coágulo | TRizol™ Reagent | 11 | 23,463 |
| | | 13 | 24,277 |
| | | 14 | 23,6 |
| | | 15 | 24,753 |
| | | 16 | 25,721 |

Fonte: elaborado pela autora.

Devido à amplificação precoce de GAPDH na amostra 1, foi definido que as

extrações de RNA das amostras do surto de 2017-2018 processadas por *Cell strainer* seriam realizadas pelo método do TRIzol™ Reagent (Invitrogen), já que estas apresentaram amplificação mais precoce do gene GAPDH (mais de 10 Cts de diferença), com relação às demais amostras analisadas. As amostras com fragmento de coágulo armazenado foram extraídas utilizando somente o TRIzol™ Reagent em contato com os fragmentos, uma vez que estas apresentaram Cts semelhantes às amostras processadas por *Cell strainer*.

O protocolo de menor eficiência foi o de congelamento por nitrogênio seguido de maceração, apresentando diferença de mais de 12 Cts em relação aos protocolos de processamento por *Cell strainer* e utilização do TRIzol™ Reagent em contato com os fragmentos de coágulos.

Apesar do alto rendimento da concentração de RNA das amostras extraídas com o bisturi seguido de maceração (Tabela 1), a amplificação tardia de GAPDH (Tabela 2) indica que estas amostras provavelmente apresentaram grande degradação. É possível que os RNAs das células no interior dos coágulos estivessem totalmente degradados, uma vez que não ficaram em contato com um inibidor de RNase.

Foram realizadas, também, padronizações da extração de DNA, utilizando 14 amostras de sangue de indivíduos voluntários saudáveis, visando otimizar a extração de DNA da fase remanescente da extração de RNA para possíveis análises posteriores, como, por exemplo, análise de SNPs nos pacientes apresentando diferentes desfechos. As amostras processadas foram utilizadas em cinco diferentes protocolos de extração de DNA, e analisadas por dosagem de concentração, amplificação do gene ABO e visualização em géis de agarose 1% (amostras 17, 18, 19, 20, 21 e 22), ou amplificação do gene ABO em reações de qPCR (amostras 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29 e 30).

Na tabela 3 estão apresentadas as concentrações (ng/μL) e resultado das amplificações (por visualização em gel de agarose ou valores de Cts) de um fragmento do gene ABO nas 14 amostras de DNA, provenientes de voluntários saudáveis, extraídas de diferentes formas.

Tabela 3 – Concentrações (ng/ μ L) e resultados das ampliações (visualização em gel de agarose 1% ou amplificação em RT-qPCR) de um fragmento do gene ABO nas 14 amostras de DNAs extraídas por diferentes métodos

| Método de extração de DNA utilizado | Identificador da amostra | Concentração (ng/ μ L) | Visualização de banda em gel de agarose 1% | Amplificação (Ct) |
|-------------------------------------|--------------------------|----------------------------|--|-------------------|
| TRIzol™ Reagent | 17 | Não detectável | Não | - |
| | 18 | 0,166 | Não | - |
| | 19 | 0,574 | Não | - |
| | 20 | 0,254 | Não | - |
| QIAamp® | 21 | 0,778 | Sim | - |
| | 22 | 0,376 | Sim | - |
| | 23 | Não detectável | - | Indeterminado |
| | 24 | Não detectável | - | 32,425 |
| Tampão BEB | 25 | Não detectável | - | Indeterminado |
| | 26 | 0,564 | - | Indeterminado |
| NucleoSpin® | 27 | Não detectável | - | Indeterminado |
| | 28 | Não detectável | - | Indeterminado |
| Wizard® | 29 | Não detectável | - | Indeterminado |
| | 30 | Não detectável | - | Indeterminado |

Fonte: elaborado pela autora.

Devido à amplificação do gene ABO somente nas amostras 21, 22 e 24, extraídas com kit QIAamp® DNA Blood Mini (Qiagen), foi definido que o DNA das amostras do surto de 2017-2018 seria extraído utilizando este kit.

5.2 Seleção de um painel de genes

Foi feita uma ampla busca na literatura por genes implicados em respostas a infecções por flavivírus e vírus em geral, alterações em quadros de hepatite e alvos que ampliem ou confirmem os dados que estão sendo gerados pela estudante de doutorado Jordana Fradico que utiliza citometria de fluxo para avaliar os perfis de mediadores solúveis no soro de pacientes com febre amarela que apresentam diferentes prognósticos, incluindo hepatite de recidiva tardia.

A partir disso, foram selecionados 44 genes envolvidos em respostas a infecções virais, principalmente flavivírus, em acometimentos no fígado ou em hepatócitos

(lipase hepática), no processo de apoptose celular (caspases 3, 8 e 9; interferons alfa 2, beta 1 e gama; proteínas quinase ativadas por mitógenos 1 e 3; e receptor do fator 2 estimulador de colônias subunidade beta) e no recrutamento e maturação de células da resposta imune inata (ligantes de quimiocina C-C 4 e C-C 21; ligantes de quimiocina C-X-C 1, C-X-C 2, C-X-C 10 e C-X-C 12; receptores de quimiocina C-X-C 1, C-X-C 2 e C-X-C 5; receptor do tipo II de interleucina 1; interleucinas 10, 18, 21, 22, 27 e 33; receptores do tipo *Toll* 3 e 7; proteína 6 do linfoma de células B; fator nuclear kappa-B 1; e fator de transformação de crescimento beta-3) (Figura 7).

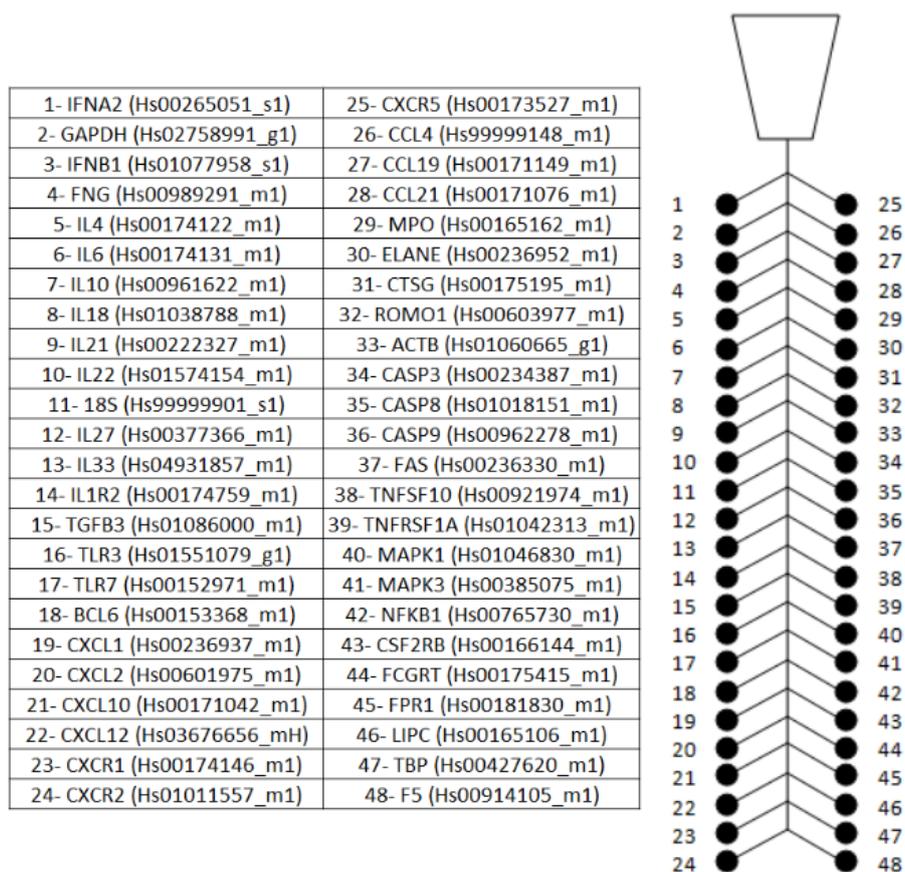
Além desses, foram escolhidos também os genes de: interleucinas 4 e 6, envolvidos com resposta a infecções virais e resposta imune inata, e processos de reparo de tecido hepático lesionado; ligante de quimiocina C-C 19, envolvido na resposta imune inata e na eliminação de vírus no fígado; receptor de morte de superfície celular, membro 1A da superfamília do receptor de TNF e membro 10 da superfamília de TNF, envolvidos nos processos de apoptose e lesões em células hepáticas; catepsina G, elastase expressa por neutrófilos e mieloperoxidase, envolvidos na liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos; fator de coagulação V, envolvido nos processos de coagulação; receptor 1 do peptídeo formil e modulador de espécies reativas de oxigênio 1, envolvidos na produção de espécies reativas de oxigênio; e fragmento Fc do receptor e transportador de IgG, envolvido no processo de transporte de IgG (Figura 7).

Mais informações a respeito desses genes e seus papéis em infecções virais serão detalhados posteriormente.

Também foram selecionados quatro genes que serviram como possíveis genes de referência: GAPDH, ACTB, TBP e 18S, que foram escolhidos por serem normalmente usados em trabalhos com amostras humanas, além de apresentarem expressões estáveis em células humanas infectadas por vírus, incluindo YFV (RADONIĆ *et al*, 2005; BARBER *et al*, 2005; MORI *et al*, 2008; HOLFORD *et al*, 2008; KUCHIPUDI *et al*, 2012).

Os ensaios TaqMan® Array Cards foram desenvolvidos a partir do painel dos 48 genes selecionados e sintetizados pela empresa Thermo Fisher Scientific. Os genes e suas posições nos cartões estão representados na figura 7.

Figura 7 – Genes selecionados e suas posições nos ensaios TaqMan® Array Cards



Representação do painel de genes selecionados, códigos dos ensaios comerciais e suas posições nos cartões. IFNA2: Interferon alfa 2; GAPDH: Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase; IFNB1: Interferon beta 1; IFNG: Interferon gama; IL4: Interleucina 4; IL6: Interleucina 6; IL10: Interleucina 10; IL18: Interleucina 18; IL21: Interleucina 21; IL22: Interleucina 22; 18S: RNA ribossômico 18S ; IL27: Interleucina 27; IL33: Interleucina 33; IL1R2: Receptor do tipo II de interleucina 1; TGFB3: Fator de transformação de crescimento beta-3; TLR3: Receptor do tipo *Toll* 3; TLR7: Receptor do tipo *Toll* 7; BCL6: Gene da proteína 6 do linfoma de células B; CXCL1: Ligante de quimiocina 1; CXCL2: Ligante de quimiocina 2; CXCL10: Ligante de quimiocina 10; CXCL12: Ligante de quimiocina 12; CXCR1: Receptor de quimiocina CXC tipo 1; CXCR2: Receptor de quimiocina CXC tipo 2; CXCR5: Receptor de quimiocina CXC tipo 5; CCL4: Ligante de quimiocina CC tipo 4; CCL19: Ligante de quimiocina CC tipo 19; CCL21: Ligante de quimiocina CC tipo 21; MPO: Mieloperoxidase; ELANE: Elastase; CTSG: Catepsina G; ROMO1: Modulador de espécies reativas de oxigênio 1; ACTB: Beta-actina; CASP3: Caspase 3; CASP8: Caspase 8; CASP9: Caspase 9; FAS: Receptor de morte celular; TNFSF10: Membro da super família de TNF10; TNFRSF1A: Receptor da super família de TNF1A; MAPK1: Proteína quinase 1; MAPK3: Proteína quinase 3; NFKB1: Fator nuclear Kappa- β subunidade 1; CSF2RB: Subunidade beta do receptor do fator 2 de estimulação de colônias; FCGRT: Fragmento Fc do receptor e transportador de IgG; FPR1: Receptor 1 do peptídeo formil; LIPC: Lipase C hepática; TBP: Proteína de ligação a TATA-box; F5: Fator de coagulação V. Fonte: elaborado pela autora.

5.3 Análise das amostras – surto de 2017-2018

Uma vez estabelecidos os melhores protocolos para a extração de ácidos nucleicos das amostras do surto de febre amarela de 2017-2018 em Minas Gerais, foram selecionadas e obtidas 62 amostras de coágulos de pacientes que apresentaram

hepatite de recidiva tardia e 62 amostras de coágulos de pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados (grupo controle), totalizando 124 amostras..

Dentro da disponibilidade de amostras de pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, foram selecionadas aquelas coletadas em três diferentes tempos: entre 07 e 15 dias após início dos sintomas (estágio inicial após a fase aguda); entre 16 e 35 dias após início dos sintomas (estágio tardio após a fase aguda); e entre 61 e 90 dias após início dos sintomas (estágio de recidiva da doença).

Apesar da maioria das amostras serem provenientes de indivíduos do sexo masculino e em idade laboral (30 a 60 anos), não foram descartadas do estudo as amostras provenientes de indivíduos de outras idades e do sexo feminino. As amostras do grupo controle apresentavam características semelhantes às do grupo hepatite de recidiva tardia.

O grupo hepatite de recidiva tardia é composto de amostras de pacientes entre 14 a 67 anos, sendo 43 amostras de indivíduos do sexo masculino e 19 de indivíduos do sexo feminino. Enquanto o grupo controle é composto de amostras de pacientes entre 17 a 65 anos, sendo 46 amostras de indivíduos do sexo masculino e 16 de indivíduos do sexo feminino.

As 124 amostras obtidas tiveram os RNAs extraídos e quantificados, porém somente as amostras que apresentaram concentração acima de 15 ng/ μ L foram utilizadas na síntese de cDNA.

Primeiramente, os cDNAs sintetizados a partir das amostras de RNA foram utilizados em ensaio de qPCR para avaliar a viabilidade de utilização nos ensaios TaqMan® Array Cards. Foram utilizados cDNAs sintetizados a partir de 200 ng de RNAs. Uma vez que nossas amostras eram limitadas e a quantidade de genes a serem analisados era consideravelmente grande e estes apresentam níveis de expressão variáveis, baseamos nossos cálculos de quantidade de RNA no protocolo dos ensaios TaqMan® Array Cards para genes que apresentam expressão moderada, o qual recomenda a utilização de 100 a 200 ng de cDNA por reservatório.

Foi definido que, para realizar as reações de qPCR com os ensaios TaqMan® Array Cards, as amostras que apresentaram valor de Ct para detecção dos transcritos de GAPDH inferior a 28 deveriam ser priorizadas, uma vez que valores tardios de Ct

podem indicar que a amostra está degradada.

Para a realização da qPCR nos ensaios de TaqMan® Array Cards, foram selecionadas 80 amostras, divididas nos seis grupos em estudo:

- FA 07-15d: 10 amostras de pacientes efetivamente curados, de 07 a 15 dias após início dos sintomas;
- FA 16-35d: 11 amostras de pacientes efetivamente curados, de 16 a 35 dias após início dos sintomas;
- FA 61-90d: 20 amostras de pacientes efetivamente curados, de 61 a 90 dias após início dos sintomas;
- Hep 07-15d: 08 amostras de pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, de 07 a 15 dias após início dos sintomas;
- Hep 16-35d: 11 amostras de pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, de 16 a 35 dias após início dos sintomas;
- Hep 61-90d: 20 amostras de pacientes que apresentaram hepatite de recidiva tardia, de 61 a 90 dias após início dos sintomas.

Para os grupos FA foram utilizadas amostras provenientes de pacientes com idade entre 17 e 65 anos (mediana de 47 anos), sendo 28 amostras de pacientes do sexo masculino e 13 do sexo feminino.

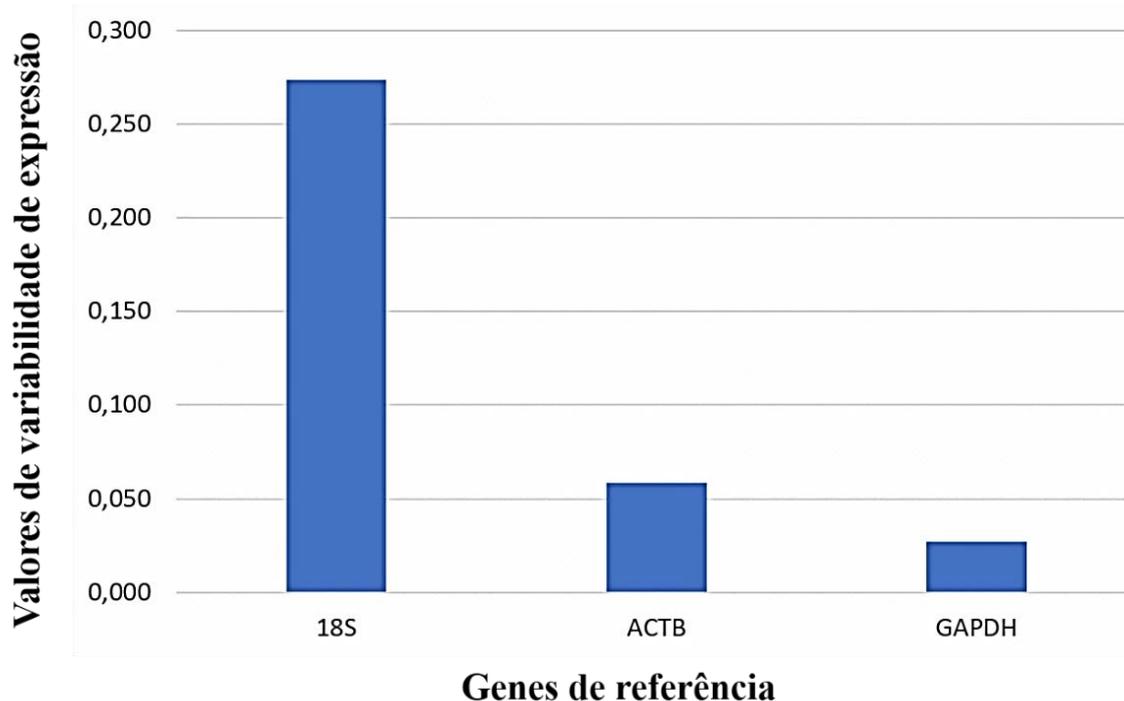
Para os grupos Hep foram utilizadas amostras provenientes de pacientes com idade entre 14 e 66 anos (mediana de 48 anos), sendo 28 amostras de pacientes do sexo masculino e 11 do sexo feminino.

Após a realização de ensaios de 8 TaqMan® Array Cards com a quantidade inicial de 200 ng, incluindo 32 amostras, e avaliação dos Cts obtidos, foram aumentadas as quantidades iniciais de RNA nos ensaios, a fim de se contornar problemas na detecção da expressão de alguns dos genes avaliados.

Após a realização de ensaios dos 20 TaqMan® Array Cards, análises no *software* NormFinder, utilizando os Cts obtidos, indicaram que os valores de variabilidade de expressão dos genes normalizadores foram: 0,274 para 18S; 0,059 para ACTB; e 0,027 para GAPDH (Gráfico 1). O gene TBP não foi expresso em todas as amostras e, como não foi possível calcular sua variabilidade de expressão, não foi utilizado

como gene normalizador.

Gráfico 1 – Valores de variabilidade de expressão dos genes normalizadores (18S, ACTB e GAPDH) utilizando NormFinder



Valores de variabilidade de expressão dos genes normalizadores: RNA ribossômico 18S (18S), Beta-actina (ACTB) e Gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH). A análise foi realizada com *software* NormFinder. Fonte: elaborado pela autora.

Os genes normalizadores GAPDH e ACTB apresentaram expressão mais estável nas amostras analisadas e foram utilizados como genes de referência nas demais análises.

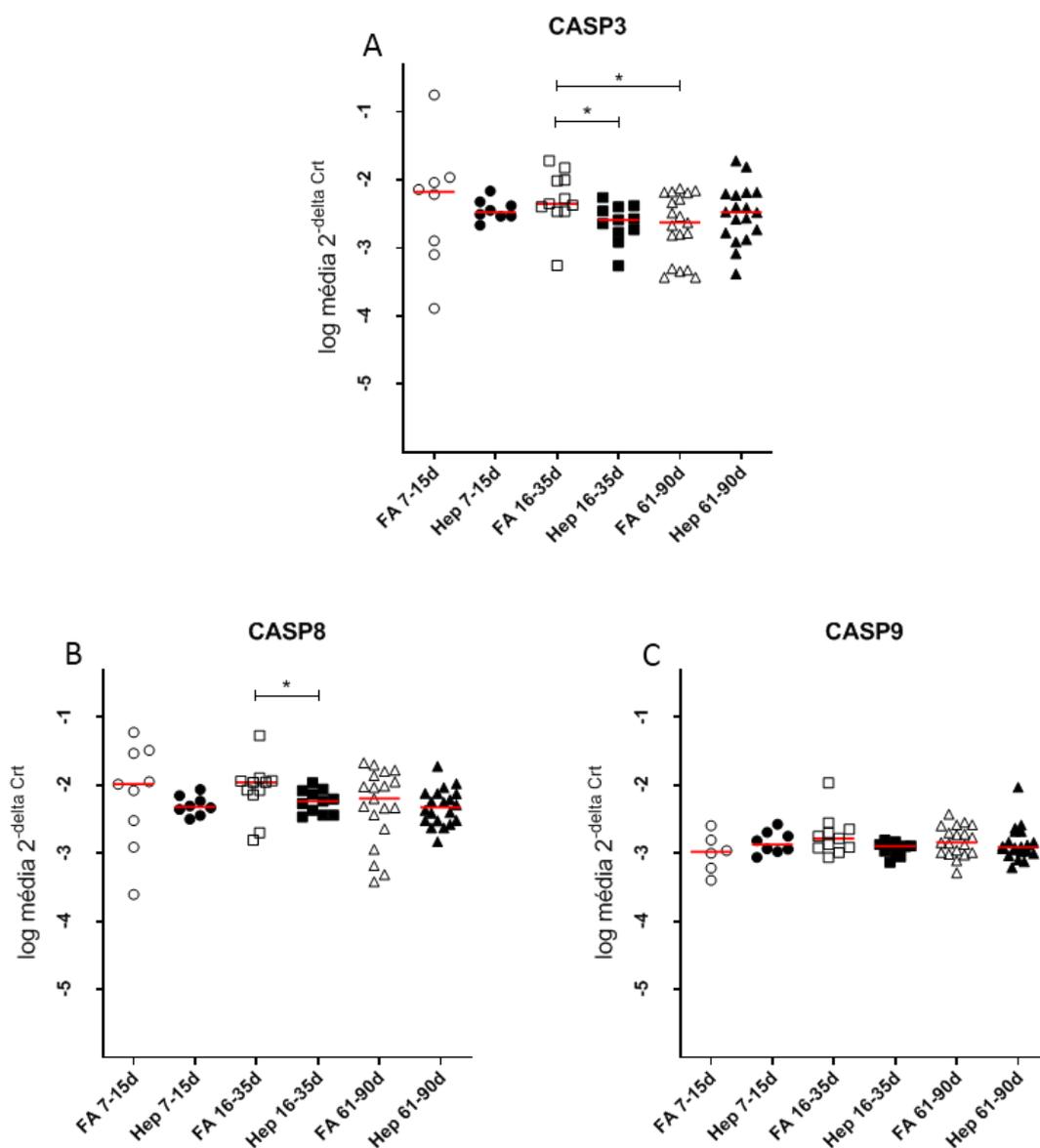
Os valores de $2^{-\Delta Ct}$ foram plotados nos gráficos a seguir e utilizados em análises estatísticas com testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

Caspase 3 (CASP3), caspase 8 (CASP8) e caspase 9 (CASP9) são membros da família das proteases de cisteína-aspartato, e são as principais caspases envolvidas na apoptose celular (LIU *et al.*, 2002; JIANG *et al.*, 2011; BEROSKE *et al.*, 2021). Sendo a CASP3 a principal caspase responsável pela apoptose celular. Caspases 8 e 10 são responsáveis pela ativação da CASP3 na via extrínseca da apoptose,

enquanto CASP9, citocromo C e outras proteínas, são responsáveis pela ativação da CASP3 na via intrínseca da apoptose (YANG *et al.*, 2003; RAMANATHAN *et al.*, 2006; PRIKHOD'KO *et al.*, 2020; BEROSKE *et al.*, 2021).

No gráfico 2 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ da expressão de CASP3, CASP8 e CASP9 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 2 – Expressão de CASP3, CASP8 e CASP9 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ da expressão de CASP3 (A), CASP8 (B) e CASP9 (C). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (Δ) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn (* $p < 0,05$). Fonte: elaborado pela autora.

Foi observado que CASP3 é 0,88 vezes mais expressa nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio tardio após fase aguda (16-35d), quando comparado aos mesmos indivíduos durante o estágio de recidiva (61-90d), bem como 0,71 vezes mais expressa quando comparado com indivíduos que apresentaram hepatite tardia, na mesma fase (16-35d). CASP8 é 0,89 vezes mais expressa nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio tardio após fase aguda (16-35d), quando comparado com indivíduos que apresentaram hepatite tardia, na mesma fase (16-35d). CASP9 parece ter expressão constante nos indivíduos dos seis grupos avaliados.

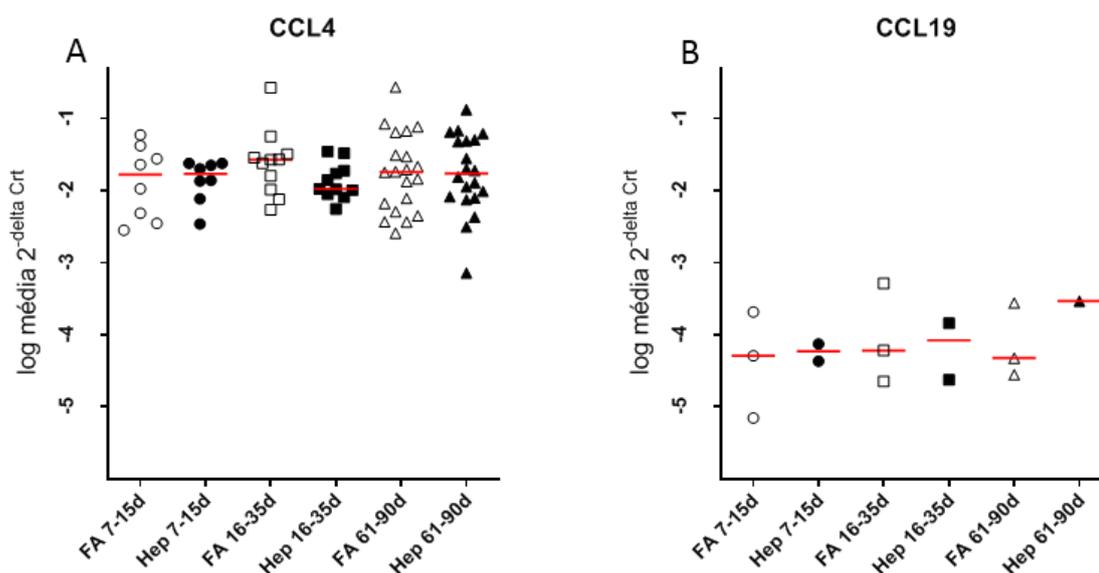
As caspases estão envolvidas na eliminação de flavivírus, por meio da apoptose celular (GHOSH *et al.*, 2014; OKAMOTO *et al.*, 2014), e o aumento de suas expressões em indivíduos que foram efetivamente curados, no estágio tardio após fase aguda (FA 16-35d), pode indicar que CASP3 e CASP8 são importantes para resolução da infecção, o que não é observado para os pacientes que evoluem para hepatite tardia.

Os ligantes de quimiocina C-C 4 (CCL4), C-C 19 (CCL19) e C-C 21 (CCL21) são proteínas quimioatratórias de macrófagos, células NK, células dendríticas e linfócitos T, participando dos processos de migração, maturação e diferenciação celular (AL-AOUKATY *et al.*, 1998; BYSTRY *et al.*, 2001; BONACCHI *et al.*, 2003; EBERHARD *et al.*, 2004; MARSLAND *et al.*, 2005; PICKENS *et al.*, 2011; CHENG, N. L., *et al.*, 2015; SHAMOON *et al.*, 2021).

CCL4 modula negativamente a expressão de receptor de quimiocina C-C 5 (CCR5), inibindo a entrada do vírus da imunodeficiência humana tipo 1 (HIV-1) em linfócitos T CD4⁺. CCL4 é mais expresso em monócitos e linfócitos T de idosos do que de adultos jovens, podendo estar relacionado com processos de suscetibilidade às doenças e senescência celular (COCCHI *et al.*, 1995; GUAN *et al.*, 2002; FRANCESCHI & CAMPISI, 2014; CHENG, N. L., *et al.*, 2015).

No gráfico 3 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ da expressão de CCL4, CCL19 e CCL21 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 3 – Expressão de CCL4, CCL19 e CCL21 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta CrT}$ da expressão de CCL4 (A), CCL19 (B) e CCL21 (C). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (\triangle) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Fonte: elaborado pela autora.

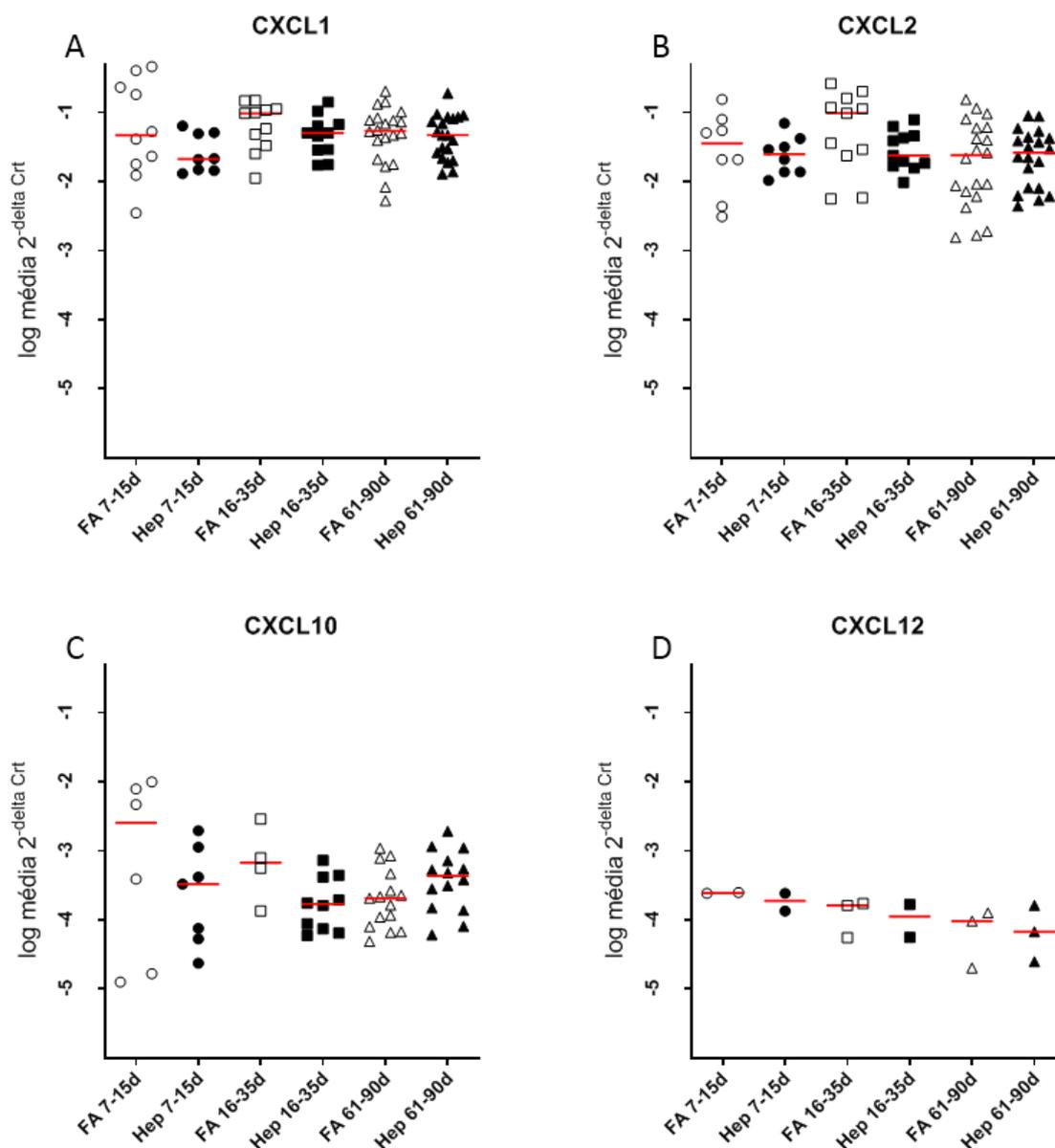
Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão dos genes entre os diferentes grupos avaliados.

CCL4 é mais expresso em todas as amostras, quando comparado à CCL19, enquanto a expressão de CCL21 foi detectável somente em um paciente (dado não mostrado). CCL19 e CCL21 são sabidamente pouco expressos nas condições analisadas, o que justifica a amplificação desses genes em poucos indivíduos (KAPUSHESKY *et al.*, 2010).

Os ligantes de quimiocina C-X-C 1 (CXCL1) e C-X-C 2 (CXCL2) são membros da família das citocinas e quimioatratadores de neutrófilos, linfócitos T citotóxicos e células NK. Enquanto os ligantes de quimiocina C-X-C 10 (CXCL10) e C-X-C 12 (CXCL12) são membros da família das citocinas e quimioatratadores de linfócitos T de memória (PIQUERAS *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2012; IMAIZUMI *et al.*, 2015; CHEN *et al.*, 2020; YAN, Q., *et al.*, 2021).

No gráfico 4 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta CrT}$ da expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL10 e CXCL12 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 4 – Expressão de CXCL1, CXCL2, CXCL10 e CXCL12 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de CXCL1 (A), CXCL2 (B), CXCL10 (C) e CXCL12 (D). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (○), Hep 07-15d (●), FA 16-35d (□), Hep 16-35d (■), FA 61-90d (△) e Hep 61-90d (▲). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Fonte: elaborado pela autora.

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão dos genes entre os diferentes grupos avaliados.

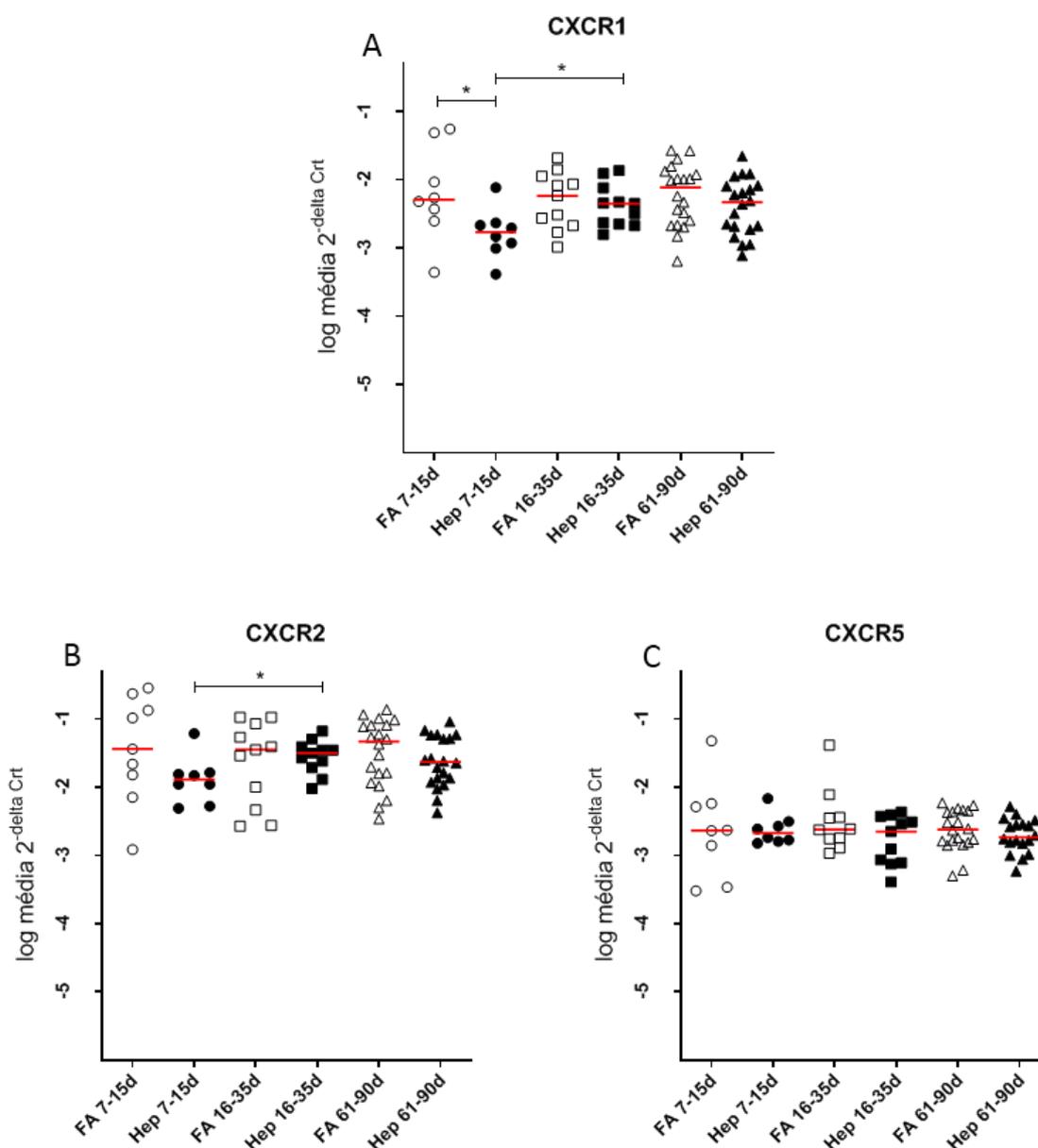
CXCL1 tem atividade hepatotóxica direta e de quimioatração de leucócitos,

sugerindo ser de grande importância para eliminação viral no fígado na fase aguda da doença (LISBONNE *et al.*, 2011), enquanto CXCL10, em indivíduos infectados pelo vírus da hepatite C, é capaz de desencadear inflamação e lesões hepáticas (ZEREMSKI *et al.*, 2008), o que não foi observado em nossos resultados.

Os receptores de quimiocina C-X-C 1 (CXCR1), C-X-C 2 (CXCR2), e C-X-C 5 (CXCR5) participam do processo de tráfico e direcionamento de linfócitos T para os locais de infecção e inflamação. CXCR1 e CXCR2 também participam da quimioatração de neutrófilos (VAN AALDEREN *et al.*, 2014; XU *et al.*, 2016; YAN, Q., *et al.*, 2021). Ainda, CXCR5 é expresso em cerca de 20% dos linfócitos T de memória circulantes no sangue. Linfócitos B e T de memória que expressam CXCR5 são atraídos por CXCL13, induzindo aumento na produção de IgG (PIQUERAS *et al.*, 2006; DEGOTTARDI *et al.*, 2020).

No gráfico 5 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de CXCR1, CXCR2 e CXCR5 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 5 – Expressão de CXCR1, CXCR2 e CXCR5 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de CXCR1 (A), CXCR2 (B) e CXCR5 (C). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (Δ) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn (* $p < 0,05$). Fonte: elaborado pela autora.

CXCR1 é 1,97 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio inicial após fase aguda (07-15d), quando comparado com indivíduos que apresentaram hepatite tardia, na mesma fase (07-15d). CXCL1 está envolvido nos processos de controle de replicação e eliminação

de WNV (MICHLMAYR & LIM, 2014).

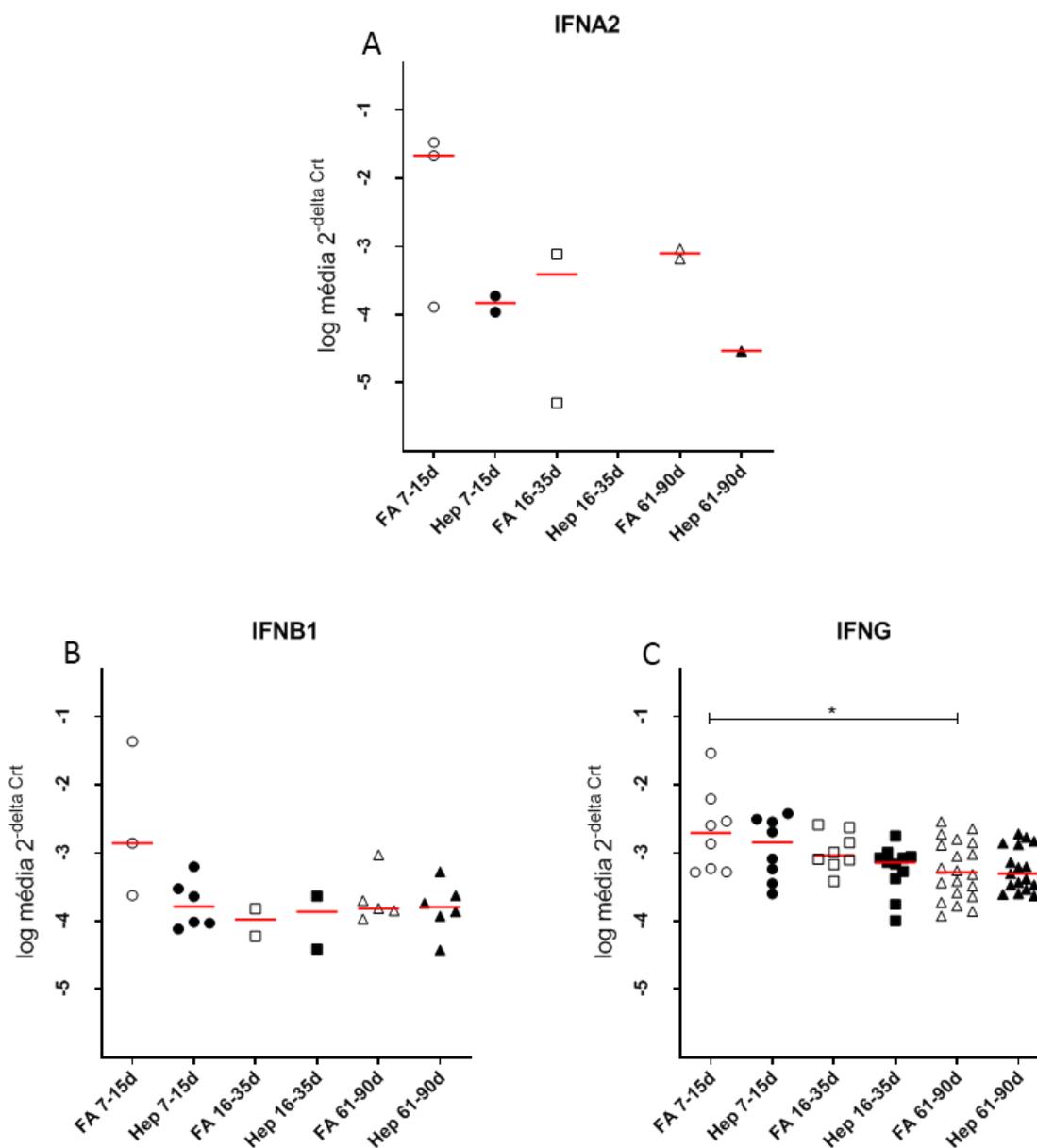
CXCR1 também é 1,6 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio tardio após fase aguda (16-35d), quando comparado com os mesmos indivíduos, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d). CXCR2 é 1,43 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio tardio após fase aguda (16-35d), quando comparado com os mesmos indivíduos, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d). Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão de CXCR5 entre os diferentes grupos avaliados.

Os interferons-alfa e -beta são interferons do tipo I que sinalizam por meio do receptor IFNAR, composto pelas subunidades IFNAR1 (IFN do tipo I se ligam a ele com baixa afinidade) e IFNAR2 (IFN do tipo I se ligam a ele com alta afinidade) (LAZEAR *et al.*, 2019).

A indução de interferons faz parte de uma resposta antiviral importantíssima, sendo a primeira linha de defesa e pode levar à apoptose celular. A resposta de IFN do tipo I é mais potente e pró-inflamatória. Infecções por *Flavivirus* são capazes de inibir a transcrição do gene que induz a produção de IFNs (MLERA *et al.*, 2014; LAZEAR *et al.*, 2019; PARK & IWASAKI, 2020).

O interferon-gama (IFNG) é um interferon do tipo II, que sinaliza por meio do receptor IFNGR, composto pelas subunidades IFNGR1 e IFNGR2. IFNGR1 é expresso moderadamente na superfície de quase todas as células, enquanto IFNGR2 é expresso em baixos níveis e de acordo com a diferenciação ou ativação da célula. IFNG é produzido por células NK e células T, e sua expressão é induzida por interleucinas 12, 15, e 18, e interferons do tipo I (SHRESTHA *et al.*, 2006; CASTRO *et al.*, 2018).

No gráfico 6 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de interferon-alfa 2 (IFNA2), interferon beta 1 (IFNB1), e IFNG nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 6 – Expressão de IFNA2, IFNB1 e IFNG nas amostras, por grupo

Log da média valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de IFNA2 (A), IFNB1 (B) e IFNG (C). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (\triangle) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Fonte: elaborado pela autora.

Foi observado que IFNG é 2,76 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio inicial após fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos no estágio de recidiva da doença (61-90d).

Estudos mostram que o IFNG participa da ativação de macrófagos e expressão de

moléculas do MHC de classes I e II durante a infecção por YFV, além de ser capaz de restringir a replicação e disseminação do vírus da febre amarela em camundongos com deficiência nos receptores de interferon do tipo I. Essa resposta é capaz de promover imunidade protetora e de longa duração contra o tipo selvagem do vírus da febre amarela nesses camundongos (QUARESMA *et al.*, 2013; LAM *et al.*, 2018).

O IFN também está envolvido na proteção contra paralisia causada pelo vírus da dengue no sistema nervoso central de camundongos, bem como na restrição da replicação viral nos tecidos extraneurais (PRESTWOOD *et al.*, 2012).

A expressão aumentada de IFNG na fase de resolução da infecção, ou seja, logo após a fase aguda, nos pacientes efetivamente curados, pode indicar que este gene é importante para gerar uma resposta adequada de recrutamento das células do sistema imune para resolução da infecção, o que não é observado para os pacientes que evoluem para hepatite tardia.

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão dos genes de interferons-alfa e -beta entre os diferentes grupos avaliados.

A interleucina 1 (IL-1) é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e monócitos, que sinaliza por meio dos receptores tipo I de interleucina 1 (IL-1R1) e tipo II de interleucina 1 (IL-1R2) (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

A interleucina 4 (IL-4) é uma citocina anti-inflamatória produzida por basófilos, eosinófilos, mastócitos e linfócitos T (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; SCHAEFFER *et al.*, 2015). A interleucina 6 (IL-6) é uma citocina pró-inflamatória e anti-inflamatória produzida por macrófagos, monócitos e neutrófilos. Em infecções por YFV foi observada maior expressão de IL6, principalmente em pacientes com febre amarela hemorrágica fatal, quando comparado a pacientes com febre amarela não hemorrágica e não fatal (TER MEULEN *et al.*, 2004; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; HOGE *et al.*, 2013; O'BRIEN *et al.*, 2015; HOLANDA *et al.*, 2019). IL-4 e IL-6 participam dos processos de reparo de tecidos e proliferação de hepatócitos em fígados lesionados (GOH *et al.*, 2013).

A interleucina 10 (IL-10) é uma citocina anti-inflamatória produzida por quase todas as células do sistema imune adaptativo e inato (SARAIVA & O'GARRA, 2010; DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; ROJAS *et al.*, 2017). A IL-10 tem capacidade de regular as

respostas inflamatórias, diminuindo a expressão de MHC de classe II e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias (IL-1, IL-6, IL-8 e TNF- α) por monócitos de indivíduos vacinados com YF-17DD (MALEFYT *et al.*, 1991; SILVA *et al.*, 2011; MARTINS *et al.*, 2008).

Após a indução de interferon do tipo I, a IL-10 é induzida por células dendríticas e macrófagos, limitando possíveis danos aos tecidos causados pelo processo inflamatório. Porém, pode favorecer infecções crônicas quando é muito expressa ou expressa por longo período (ROJAS *et al.*, 2017).

A interleucina 18 (IL-18) é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e monócitos, e mais expressa em pacientes infectados com DENV (VALERO *et al.*, 2019).

A interleucina 21 (IL-21) é uma citocina pró-inflamatória produzida principalmente por linfócitos T, e está associada à maior produção de IgG específico contra DENV (NURIEVA *et al.*, 2009; VIVANCO-CID *et al.*, 2014).

A interleucina 22 (IL-22) é uma citocina anti-inflamatória produzida por linfócitos T e células NK, que está envolvida no processo de proteção e sobrevivência dos hepatócitos, prevenindo e reparando lesões hepáticas. IL-22 também apresenta perfil pró-inflamatório em indivíduos com doença de Crohn (RADAEVA *et al.*, 2004; BRAND *et al.*, 2006; ZENEWICZ *et al.*, 2007; WANG *et al.*, 2012).

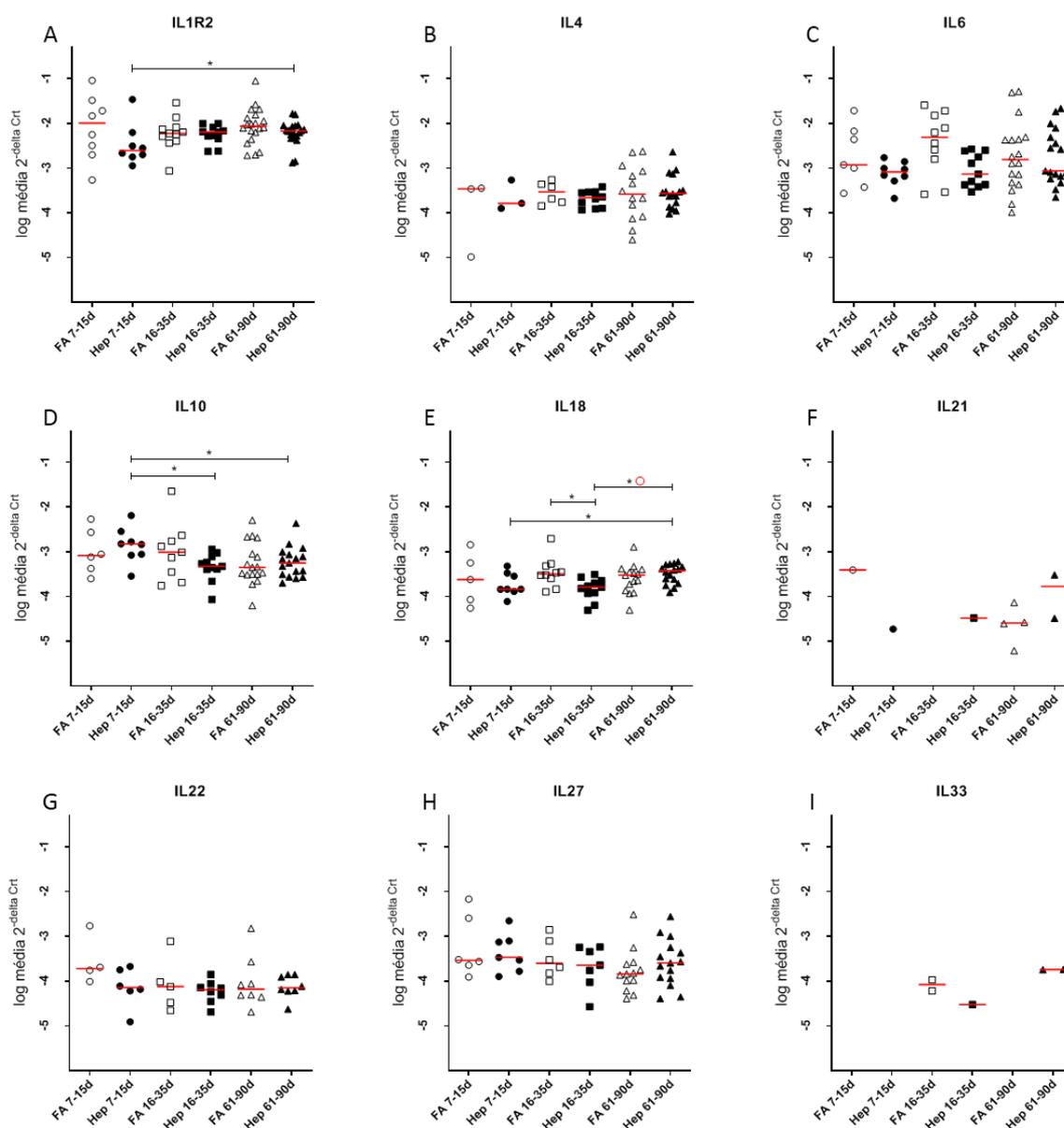
A interleucina 27 (IL-27) é uma citocina anti-inflamatória produzida por linfócitos T produtores de IL-10. IL-27 também apresenta perfil pró-inflamatório, quando, juntamente com a interleucina 12, promove resposta Th1 induzida por IFNG. Está envolvida na inibição da replicação do HIV-1, em linfócitos T e macrófagos, e de HCV, nos hepatócitos (FRANK *et al.*, 2010; SCOTTO *et al.*, 2011; APARICIO-SIEGMUND & GARBERS, 2015).

A interleucina 33 (IL-33) é uma citocina pró-inflamatória expressa em células endoteliais e epiteliais, mastócitos, linfócitos T, eosinófilos, basófilos, células dendríticas e células NK. Durante a infecção por DENV2, IL33 é mais expressa e induz a quimioatração de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias, agravando os sintomas (FRANCA *et al.*, 2016; MARQUES *et al.*, 2018).

No gráfico 7 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ da expressão de

IL1R2, IL4, IL6, IL10, IL18, IL21, IL22, IL27 e IL33 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 7 – Expressão de IL1R2, IL4, IL6, IL10, IL18, IL21, IL22, IL27 e IL33 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de IL1R2 (A), IL4 (B), IL6 (C), IL10 (D), IL18 (E), IL21 (F), IL22 (G), IL27 (H) e IL33 (I). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (○), Hep 07-15d (●), FA 16-35d (□), Hep 16-35d (■), FA 61-90d (△) e Hep 61-90d (▲). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney (* p<0,05) e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn (○ p<0,05). Fonte: elaborado pela autora.

IL1R2 é 1,74 vezes mais expressa nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio de recidiva da doença (61-90d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d).

IL10 é 2,14 vezes mais expressa nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio tardio após a fase aguda (16-35d), bem como 1,65 vezes mais expressa quando comparado aos mesmos pacientes no estágio de recidiva da doença (61-90d).

Foi observado que IL18 é 1,57 vezes mais expressa em pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio de recidiva da doença (61-90d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio inicial (07-15d), bem como 1,31 vezes mais expressa quando comparado aos mesmos pacientes no estágio tardio (16-35d) após a fase aguda.

Como previamente mencionado, IL18 é uma citocina pró-inflamatória produzida por macrófagos e monócitos. A expressão aumentada de IL18 em indivíduos apresentando hepatite tardia (61-90d) pode ser devido a processos inflamatórios existentes pela presença do vírus.

No estágio tardio após a fase aguda (16-35d), foi observado que IL18 é 0,97 vezes mais expressa nos indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, quando comparado aos pacientes que apresentaram hepatite tardia.

IL18 codifica uma citocina pró-inflamatória e é mais expresso em pacientes infectados com DENV e ZIKV (VALERO *et al.*, 2018; VALERO *et al.*, 2019). É possível que os pacientes consigam resolver a infecção devido a um perfil mais inflamado no período inicial da infecção e que é importante para acionar mecanismos imunes que contribuem para a resolução da infecção viral (FRADICO *et al.*, 2021, comunicação pessoal).

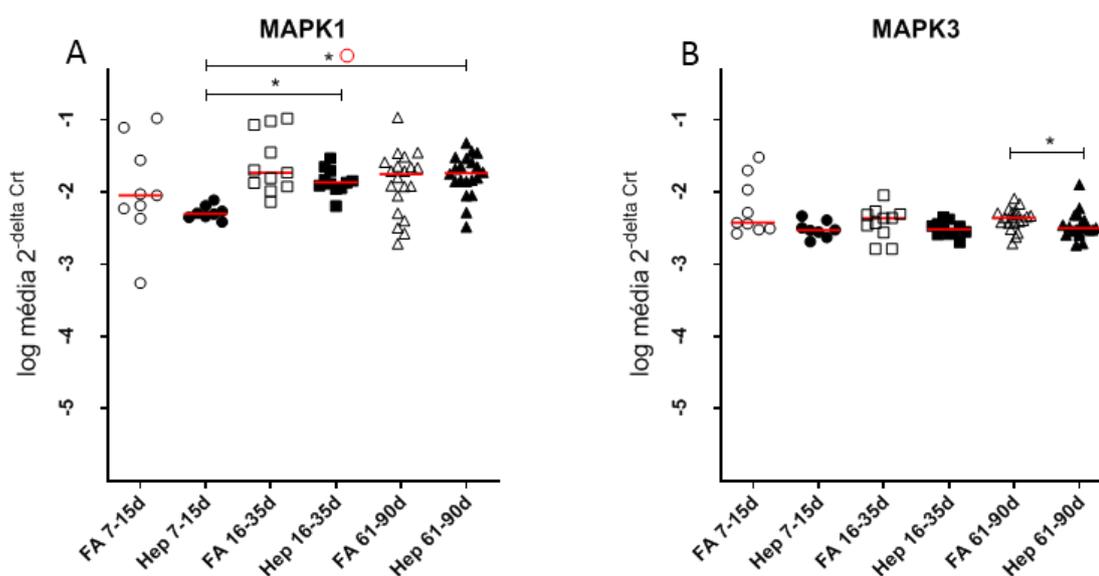
Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão dos genes IL4, IL6, IL21, IL22, IL27 e IL33 entre os diferentes grupos avaliados. A expressão de IL21 e IL33 foi detectada somente em alguns indivíduos, independente do desfecho clínico.

Proteínas quinase ativadas por mitógenos 1 (MAPK1) e 3 (MAPK3) são proteínas pertencentes à via de sinalização importante para o sucesso da replicação de alguns vírus, como DENV, WNV e HCV (ALBARNAZ *et al.*, 2014). Inibidores da via de MAPKs são capazes de reduzir a replicação de YFV, ZIKV, DENV e HCV (ZHANG *et*

al., 2012; ALBARNAZ *et al.*, 2014; CHENG *et al.*, 2018; SREEKANTH *et al.*, 2018). As MAPKs também estão envolvidas nos processos de apoptose, regulação da expressão gênica, diferenciação e proliferação celular (SREEKANTH *et al.*, 2018).

No gráfico 8 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ da expressão de MAPK1 e MAPK3 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 8 – Expressão de MAPK1 e MAPK3 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ da expressão de MAPK1 (A) e MAPK3 (B). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (Δ) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn (\circ $p < 0,05$). Fonte: elaborado pela autora.

Foi observado que MAPK1 é 1,69 vezes mais expressa em pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio tardio após a fase aguda (16-35d) e 2,64 vezes nestes pacientes no estágio de recidiva da doença (61-90d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d).

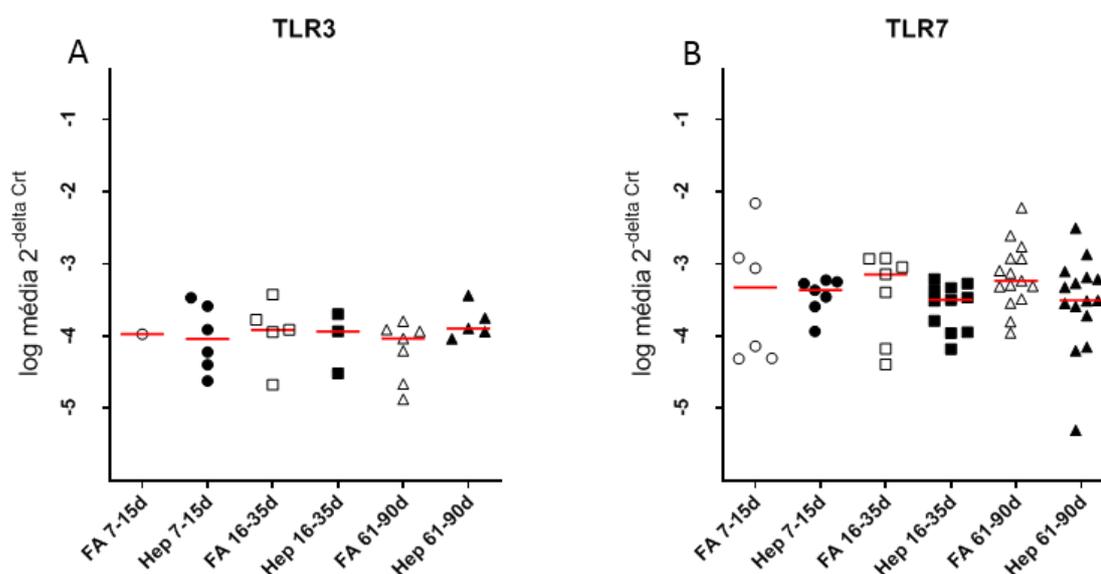
MAPK3 é 0,39 vezes mais expressa nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio de recidiva da doença (61-90d), quando comparado aos indivíduos que apresentaram hepatite tardia, na mesma fase. A expressão reduzida nesses indivíduos pode indicar diminuição na apoptose celular (SREEKANTH *et al.*, 2018) e persistência da infecção viral.

Os receptores do tipo *Toll* (TLRs) são receptores de reconhecimento de padrões,

envolvidos no recrutamento e maturação de células dendríticas e células NK. Essas células, após estímulo mediado por TLRs, podem eliminar células infectadas por vírus. Além disso, em infecções por vírus de RNA, os TLRs ativam respostas por interferons (SIVORI *et al.*, 2004; LAUZON *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2009; YAN, Q., *et al.*, 2021).

No gráfico 9 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ da expressão de receptores do tipo *Toll* 3 (TLR3) e 7 (TLR7) nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 9 – Expressão de TLR3 e TLR7 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta\text{Ct}}$ da expressão de TLR3 (A) e TLR7 (B). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (\triangle) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Fonte: elaborado pela autora.

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa na expressão dos genes entre os diferentes grupos avaliados.

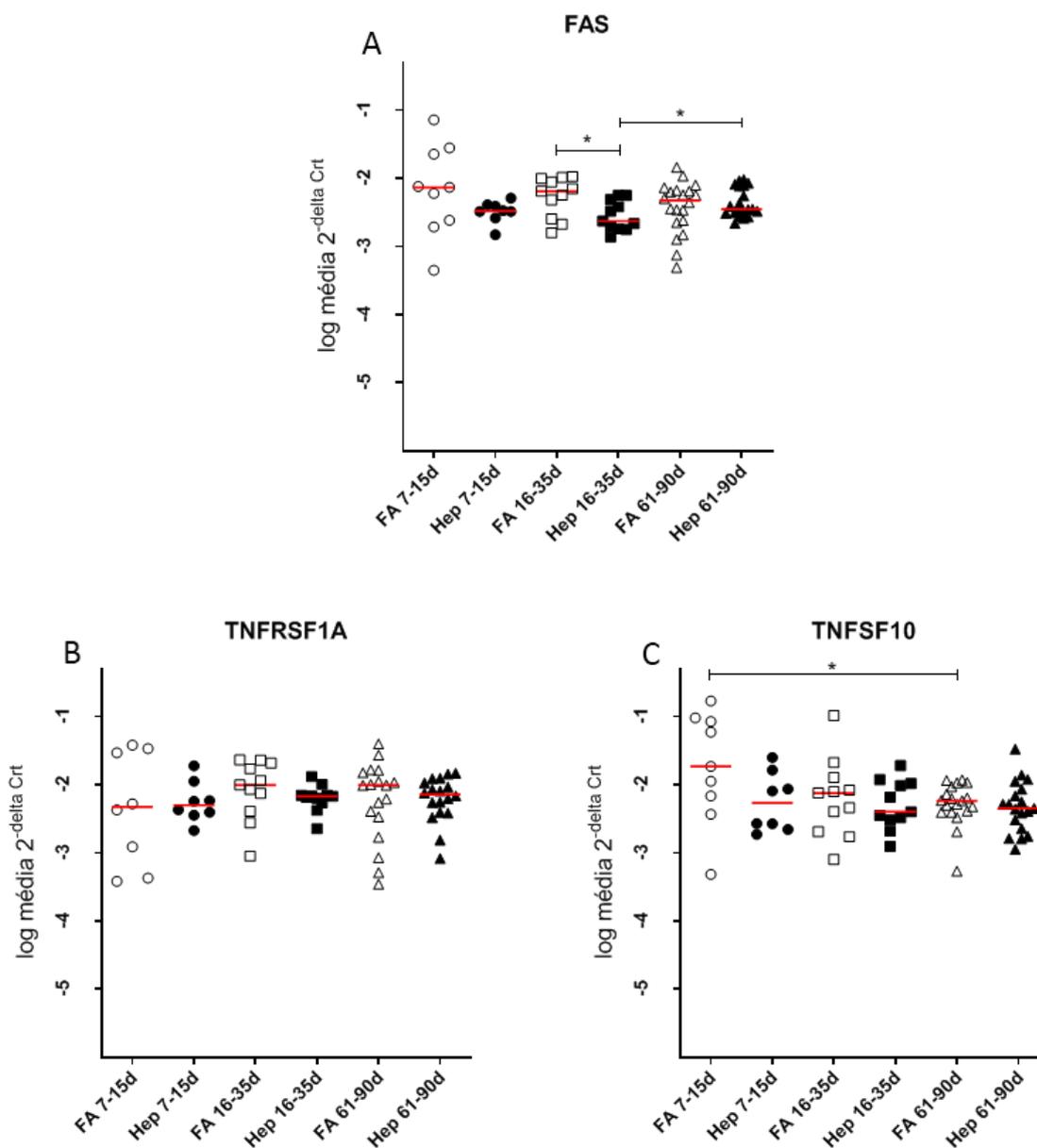
A detecção da expressão de TLR3 foi possível para um número reduzido de pacientes que apresentaram ou não hepatite tardia, independente do período da infecção. A baixa expressão de TLR3 em amostras de sangue já é relatada em banco de dados de expressão (KAPUSHESKY *et al.*, 2010).

A ativação de receptores da família do fator de necrose tumoral (TNF), como receptor de morte de superfície celular (FAS), membro 1A da superfamília do

receptor de TNF (TNFRSF1A) e membro 10 da superfamília de TNF (TNFSF10), é capaz de induzir apoptose celular (BEROSKE *et al.*, 2021; YAN, Q., *et al.*, 2021).

FAS é uma proteína envolvida na morte celular no fígado e no processo de hepatite fulminante. Durante infecção por YFV os linfócitos se ligam aos receptores de FAS e desencadeiam a apoptose de hepatócitos, gerando lesões hepáticas e um quadro de febre amarela grave (OGASAWARA *et al.*, 1993; QUARESMA *et al.*, 2006).

No gráfico 10 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ da expressão de FAS, TNFRSF1A e TNFSF10 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 10 – Expressão de FAS, TNFRSF1A e TNFSF10 nas amostras, por grupo

Log da média dos valores de $2^{-\Delta\text{CrT}}$ da expressão de FAS (A), TNFRSF1A (B) e TNFSF10 (C). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (\triangle) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn (* $p < 0,05$). Fonte: elaborado pela autora.

No estágio tardio após a fase aguda (16-35d), foi observado que FAS é 1,73 vezes mais expresso em indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, quando comparado aos pacientes que apresentaram hepatite tardia.

Também foi possível observar que FAS é 0,48 vezes mais expresso em indivíduos que apresentaram hepatite tardia, no estágio de recidiva da doença (61-90d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio tardio após a fase aguda (16-35d).

FAS desencadeia a apoptose de hepatócitos por meio da ativação de CASP8 e, conseqüentemente, CASP3 (GALLE *et al.*, 1995; GUICCIARDI & GORES, 2009; LIU *et al.*, 2015). É possível que a expressão aumentada de FAS, bem como a de CASP3 e CASP8, em indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados (FA 16-35d) pode indicar que esses genes são importantes para resolução da infecção, o que não é observado para os pacientes que evoluem para hepatite tardia.

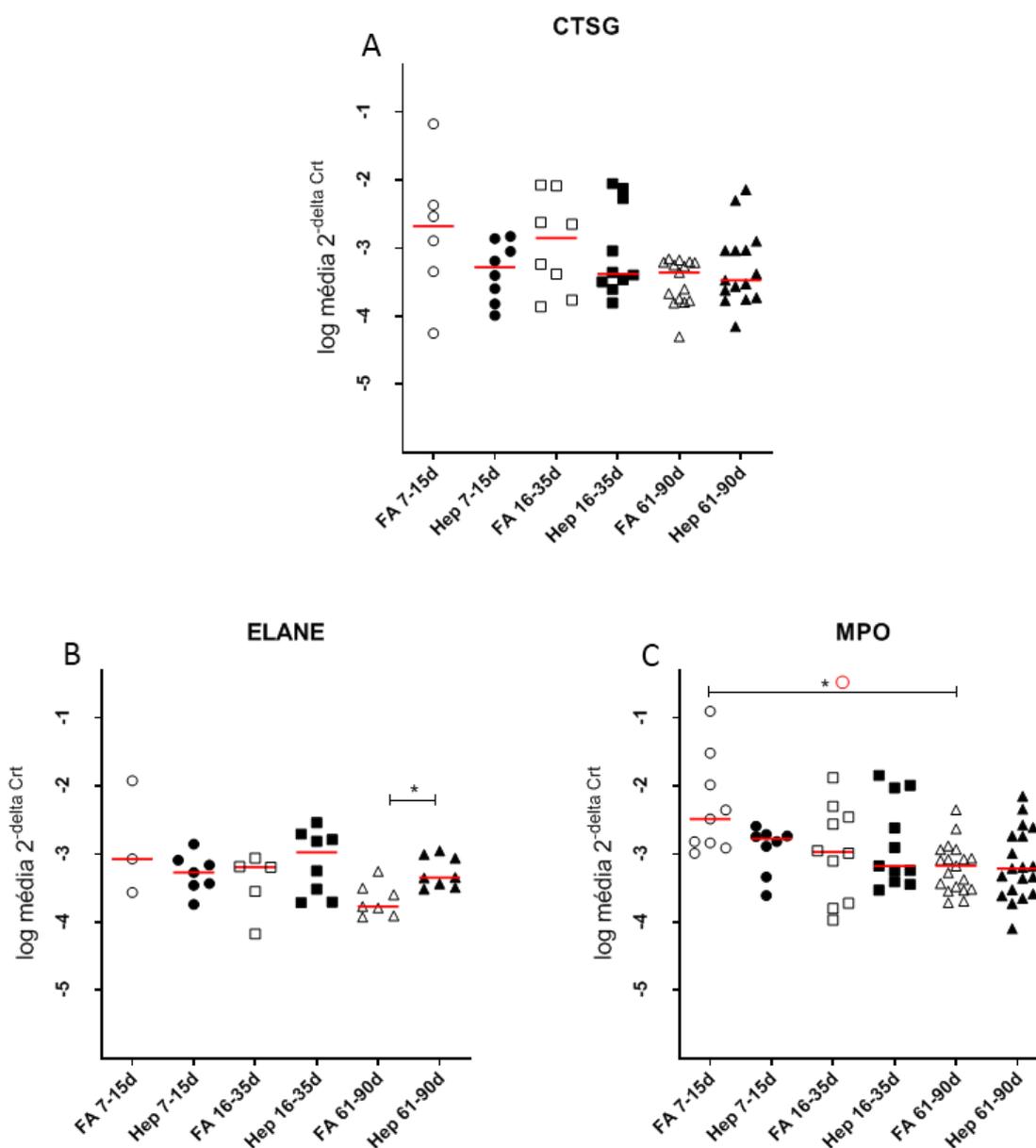
TNFSF10 é 2,18 vezes mais expresso em indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio de recidiva da doença (61-90d).

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão de TNFRSF1A entre os diferentes grupos avaliados.

A catepsina G (CTSG), elastase expressa por neutrófilos (ELANE), e mieloperoxidase (MPO) são proteínas expressas em grânulos de neutrófilos. Estão envolvidas na liberação de armadilhas extracelulares dos neutrófilos (*Neutrophil extracellular traps* – NETs), responsáveis por capturar e matar bactérias (BRINKMANN *et al.*, 2004; FONTOURA *et al.*, 2021; YAN, Q., *et al.*, 2021; MANCILLA-GALINDO & GALINDO-SEVILLA, 2021).

No gráfico 11 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ da expressão de CTSG, MPO e ELANE nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 11 – Expressão de CTSG, ELANE e MPO nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta Ct}$ da expressão de CTSG (A), ELANE (B) e MPO (C). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (\triangle) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn (\circ $p < 0,05$). Fonte: elaborado pela autora.

No estágio de recidiva da doença (61-90d), ELANE é 1,66 vezes mais expressa nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, quando comparado aos indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados.

MPO é 3,89 vezes mais expressa em pacientes que apresentaram febre amarela e

foram efetivamente curados, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio de recidiva da doença (61-90d).

É relatado que pacientes com dengue grave apresentam maior atividade de elastase do que pacientes com dengue não grave (KUNDER *et al.*, 2018).

Há uma participação efetiva de neutrófilos no contexto da infecção por YFV, e hepatite tardia, principalmente nos tecidos hepáticos próximos às lesões (QUARESMA *et al.*, 2013; KALLAS *et al.*, 2019; REZENDE *et al.*, 2020; OSÓRIO *et al.*, 2020), o que pode justificar a maior expressão de ELANE nos indivíduos que apresentaram hepatite tardia (Hep 61-90d).

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão de CTSG entre os diferentes grupos avaliados.

Durante a busca pelos genes avaliados neste trabalho, selecionamos também os genes cujas funções estão descritas a seguir.

A proteína 6 do linfoma de células B (BCL-6) que é expressa em células B maduras nos centros germinativos (MIGLIAZZA *et al.*, 1995). A expressão de BCL6 é regulada por IL-6 e IL-21. BCL-6 participa da diferenciação de células T auxiliares em células T auxiliares foliculares. Sua elevada expressão, em células de linfoma não-Hodgkin, reprime a transcrição de vários genes envolvidos na diferenciação de células e apoptose, favorecendo a neoplasia de células B (LOSSOS *et al.*, 2003; NURIEVA *et al.*, 2009).

O receptor do fator 2 estimulador de colônias subunidade beta (CSF2RB) é um receptor do fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos (GM-CSF). Em pacientes com câncer colorretal foi visto que CSF2RB participa da via intrínseca da apoptose e da regulação das vias de sinalização de MAPKs e NF-κB (SHEN *et al.*, 1992; SLATTERY *et al.*, 2018).

O fator de coagulação V (F5) é um cofator não enzimático envolvido no complexo da protrombinase. O F5 é sintetizado no fígado e circula no plasma e plaquetas (MANN & KALAFATIS, 2003; ASSELTA *et al.*, 2006).

O receptor 1 do peptídeo formil (FPR-1) é um receptor de reconhecimento de padrões expresso em macrófagos, monócitos e, principalmente, neutrófilos, e está envolvido nos processos de defesa contra bactérias, por meio da fagocitose e

produção de ROS (GEMPERLE *et al.*, 2012; LIU *et al.*, 2012; VACCHELLI *et al.*, 2020).

O fragmento Fc do receptor e transportador de IgG (FCGRT) codifica o receptor Fc neonatal (FcRn), que transporta IgG da mãe para o feto e participa do processo de apresentação de antígenos por células dendríticas e previne a perda de IgG e albumina no fígado. FcRn é induzido por TNF- α e expresso em monócitos, macrófagos, células dendríticas e linfócitos B (KANDIL *et al.*, 1996; KUO *et al.*, 2010).

A lipase hepática (LIPC) é uma glicoproteína responsável pela hidrólise de lipídeos, que atua na regulação dos níveis de triglicerídeos, fosfolipídios e colesterol. É sintetizada e secretada pelo fígado e se liga na superfície dos hepatócitos e células endoteliais hepáticas. Também pode ser encontrada nas glândulas suprarrenais, ovários e macrófagos (ZAMBON *et al.*, 1998; JANSEN *et al.*, 2002; CHATTERJEE & SPARKS, 2006).

O gene NFKB1 que codifica a proteína fator nuclear-kappa-B 1 (NF- κ B), pertencente à via de sinalização pró-inflamatória, responsável pela regulação de centenas de genes (BEST *et al.*, 2019). Infecções agudas por WNV, DENV e outros vírus, são capazes de induzir aumento na atividade de NF- κ B, produzindo citocinas pró-inflamatórias e gerando apoptose. É ativada, também, em células hepáticas humanas infectadas pelo vírus da hepatite C (KESSON & KING, 2001; KESSON *et al.*, 2002; BONACCHI *et al.*, 2003; CHENG, Y. L., *et al.*, 2015).

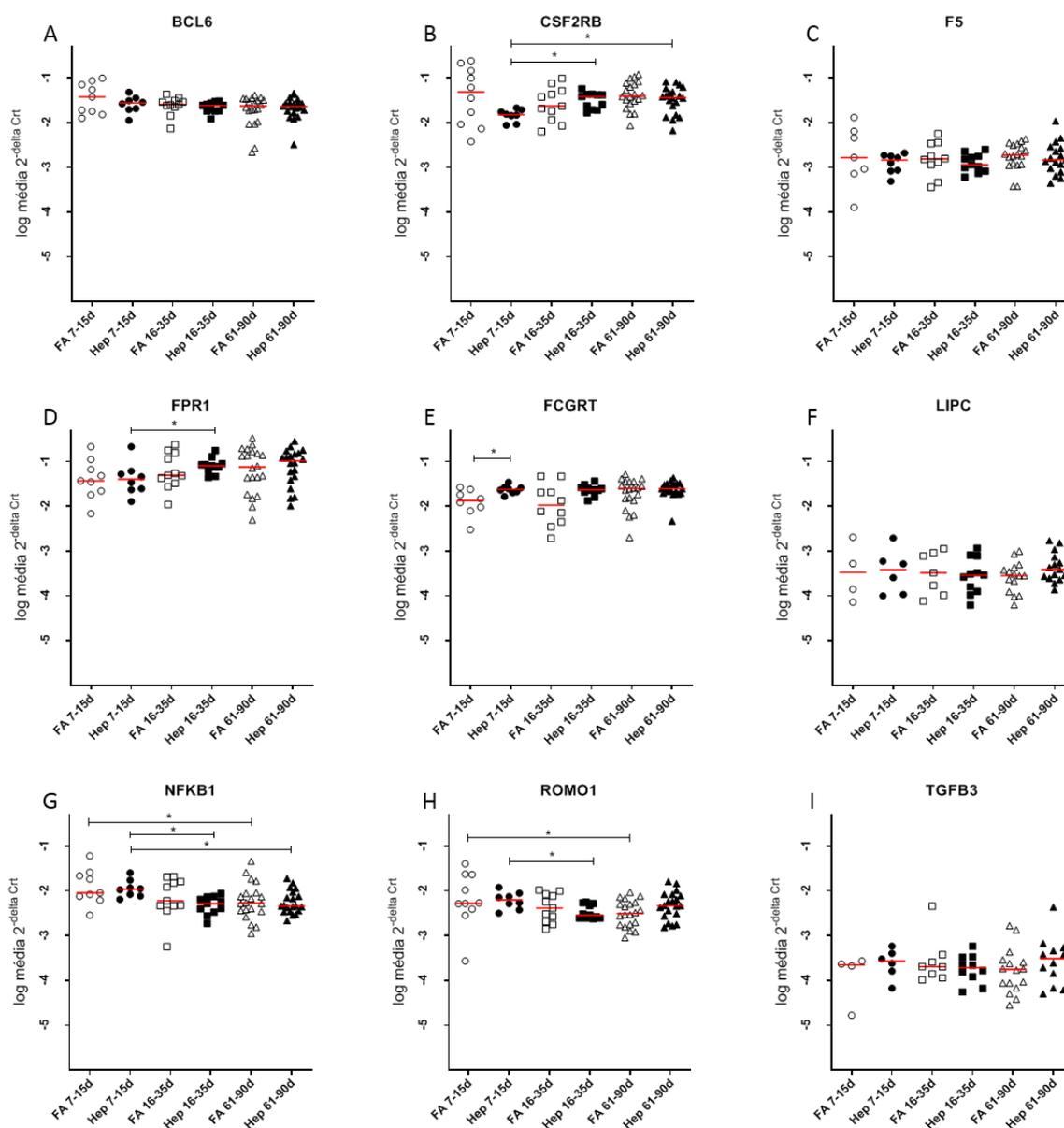
O modulador de espécies reativas de oxigênio 1 (ROMO1) é uma proteína responsável por induzir a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS), que desencadeiam dano e morte celular (CHUNG *et al.*, 2006; ZHANG *et al.*, 2019). Infecções por vírus da família *Flaviviridae*, como DENV, ZIKV, HCV e WNV, são capazes de induzir estresse oxidativo. Entretanto, durante as infecções virais os sistemas antioxidantes podem ser induzidos, levando à cronificação da doença, uma vez que há redução de morte de células infectadas, como no caso de hepatite C (IVANOV *et al.*, 2013; ZHANG *et al.*, 2019).

TGF- β 3 é uma proteína pertencente à superfamília do fator de crescimento transformador beta, e está envolvida no processo de diferenciação de linfócitos T (HERPIN *et al.*, 2004; XU *et al.*, 2018).

O fator de transformação de crescimento beta-3 (TGF- β 3) está associado à apoptose em casos de carcinoma hepatocelular causado por infecção pelo vírus da hepatite B, enquanto sua inibição está associada à susceptibilidade à infecção por ZIKV em células-tronco embrionárias (WANG *et al.*, 2015; SHERIDAN *et al.*, 2018).

No gráfico 12 estão representadas as médias dos valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ da expressão de BCL6, CSF2RB, F5, FPR1, FCGRT, LIPC, NFKB1, ROMO1 e TGFB3 nas amostras dos seis grupos avaliados.

Gráfico 12 – Expressão de BCL6, CSF2RB, F5, FPR1, FCGRT, LIPC, NFKB1, ROMO1 e TGFB3 nas amostras, por grupo



Log da média dos valores de $2^{-\Delta Crt}$ da expressão de BCL6 (A), CSF2RB (B), F5 (C), FPR1 (D), FCGRT (E), LIPC (F), NFKB1 (G), ROMO1 (H) e TGFB3 (I). Os valores foram plotados por grupo: FA 07-15d (\circ), Hep 07-15d (\bullet), FA 16-35d (\square), Hep 16-35d (\blacksquare), FA 61-90d (\triangle) e Hep 61-90d (\blacktriangle). A linha vermelha representa a mediana. A análise estatística foi realizada pelos testes de Mann-Whitney (* $p < 0,05$) e Kruskal-Wallis, seguido de pós-teste de Dunn. Fonte: elaborado pela autora.

Foi observado que CSF2RB é 1,53 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio tardio após a fase aguda (16-35d), bem como 1,42 vezes mais expresso nestes pacientes no estágio de recidiva (61-90d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d).

FPR1 é uma vez mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio tardio após a fase não aguda (16-35d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d).

Também foi observado que FCGRT é 0,77 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, durante a mesma fase.

NFKB1 é 0,69 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio de recidiva da doença (61-90d).

NFKB1 também é 1,09 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio tardio após a fase aguda (16-35d), bem como 1,36 vezes mais expresso quando comparado aos mesmos indivíduos no estágio de recidiva da doença (61-90d).

ROMO1 é 0,7 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio de recidiva da doença (61-90d). ROMO1 também é 1,2 vezes mais expresso nos pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio inicial após a fase aguda (07-15d), quando comparado aos mesmos indivíduos, no estágio tardio após a fase aguda (16-35d).

Não foi possível observar diferença estatisticamente significativa da expressão dos genes BCL6, F5, LIPC e TGFB3 entre os diferentes grupos avaliados.

Apesar de estudos indicarem que níveis reduzidos de fator V (F5) são associados a casos graves em pacientes com febre amarela, bem como ao agravamento em quadros de lesão hepática aguda (ELINAN *et al.*, 2005; GRUPTA *et al.*, 2017; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2020d), e valores elevados de LIPC serem observados nos surtos recentes de febre amarela, e associados a casos graves da doença (CASADIO *et al.*, 2019; HO *et al.*, 2019), nenhuma diferença de expressão desses genes foi observada nas análises realizadas.

Para avaliar de forma global os resultados obtidos, foi realizada uma análise de componentes principais (PCA) com os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ de todos os genes, exceto CCL21 (devido à detecção de expressão deste gene em apenas um dos indivíduos incluídos nesse estudo, o que impossibilita o cálculo da variância), para verificar se havia um padrão de expressão dos genes em relação aos diferentes grupos amostrais (presença ou ausência de hepatite e o tempo de coleta após início dos sintomas) (Gráfico 13).

Gráfico 13 – Análise de componentes principais do perfil de expressão dos genes analisados nas amostras

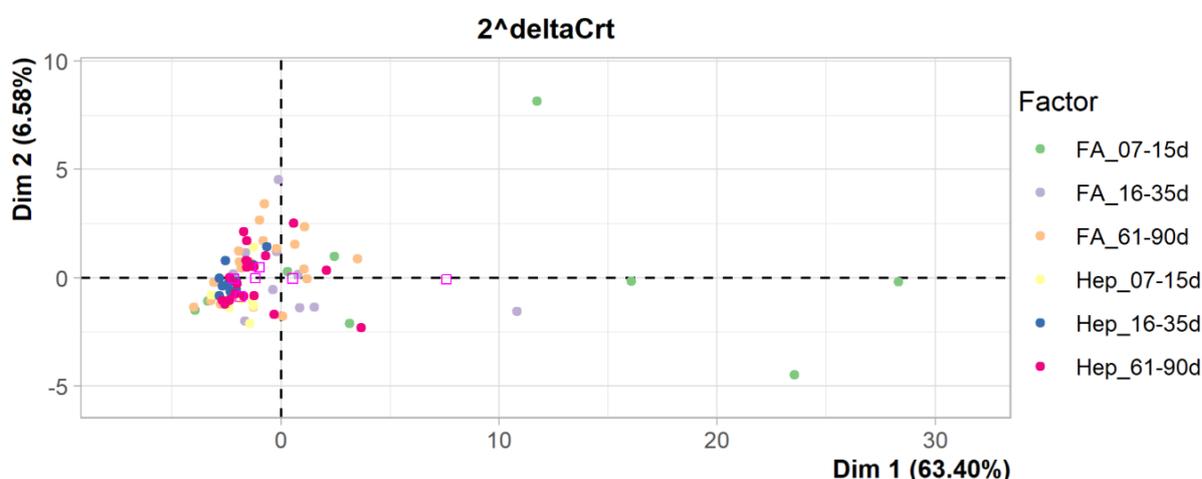


Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) para todas as amostras, considerando os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ de todos os genes analisados, exceto CCL21. A legenda mostra as cores para cada grupo: FA 07-15d (verde), FA16-35d (roxo), FA 61-90d (laranja), Hep 07-15d (amarelo), Hep 16-35d (azul) e Hep 61-90d (vermelho). Fonte: elaborado pela autora.

O pacote missMDA foi utilizado para esta análise pois este executa a análise de PCA em conjuntos de dados incompletos, uma vez que alguns genes não foram expressos em todas as amostras (JOSSE & HUSSON, 2016). De forma geral, não há variância suficiente que possibilite a separação dos grupos de pacientes que apresentaram ou não hepatite tardia nos três tempos analisados.

Para verificar os padrões de expressão entre as amostras de pacientes efetivamente curados e aqueles que apresentaram hepatite tardia, foram realizadas análises de PCA em cada tempo de coleta utilizado neste estudo. Assim, para o tempo 07-15d, foi realizado um PCA com os valores de $2^{-\Delta\text{Crt}}$ de todos os genes, exceto CCL21,

IL33 e IL21 (Gráfico 14).

Gráfico 14 – Análise de componentes principais do perfil de expressão no tempo 07-15d

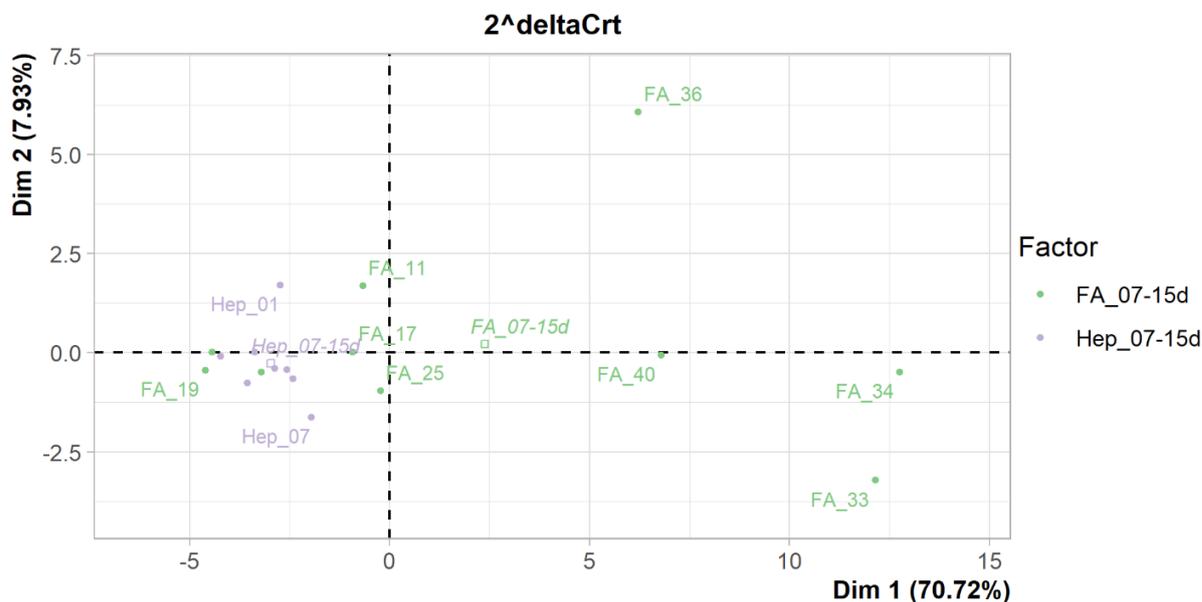


Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) para as amostras dos grupos FA 07-15d (verde) e Hep 07-15d (roxo), considerando os valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ de todos os genes analisados, exceto CCL21, IL33 e IL21. Fonte: elaborado pela autora.

É possível observar que há uma maior discrepância entre os perfis de expressão dos marcadores dos grupos FA 07-15d e Hep 07-15d, porém sem uma separação entre eles.

Para o tempo 16-35d, foi realizado um outro PCA com os valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ de todos os genes, exceto CCL21, IFNA2, IL33 e IL21 e Hep 16-35d (Gráfico 15).

Gráfico 15 – Análise de componentes principais do perfil de expressão no tempo 16-35d

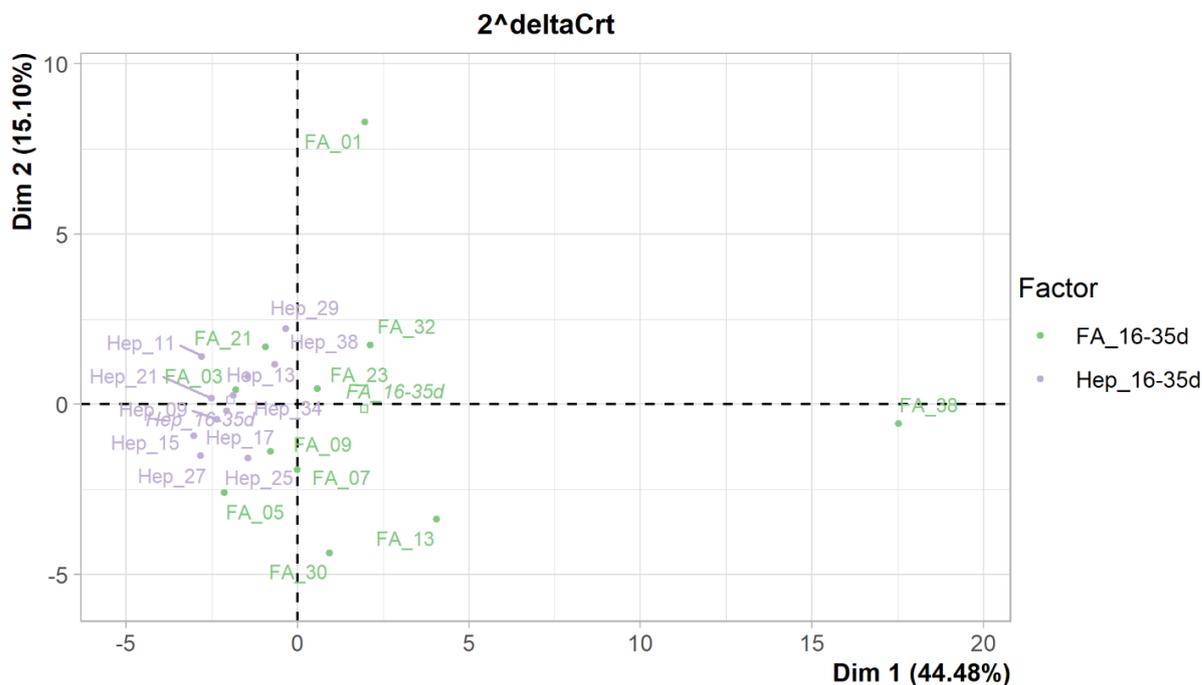


Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) para as amostras dos grupos FA 16-35d (verde) e Hep 16-35d (roxo), considerando os valores de $2^{-\Delta Crt}$ de todos os genes analisados, exceto CCL21, IFNA2, IL33 e IL21. Fonte: elaborado pela autora.

Não é possível observar separação entre os perfis de expressão dos marcadores dos grupos FA 16-35d e Hep 16-35d.

Para o tempo 61-90d, foi realizado um PCA com os valores de $2^{-\Delta Crt}$ de todos os genes, exceto CCL21 e IL33 (Gráfico 16).

Gráfico 16 – Análise de componentes principais do perfil de expressão no tempo 61-90d

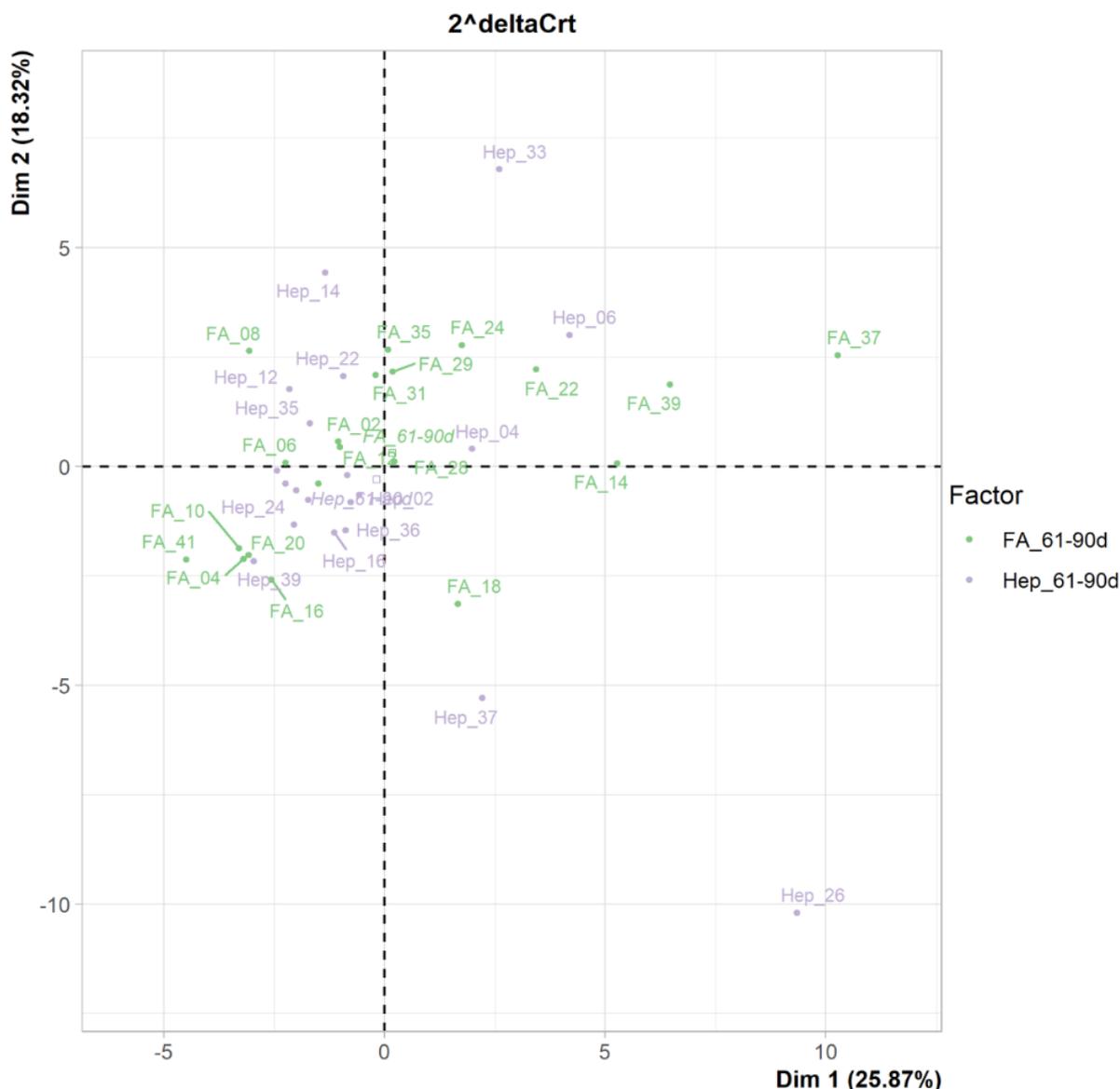
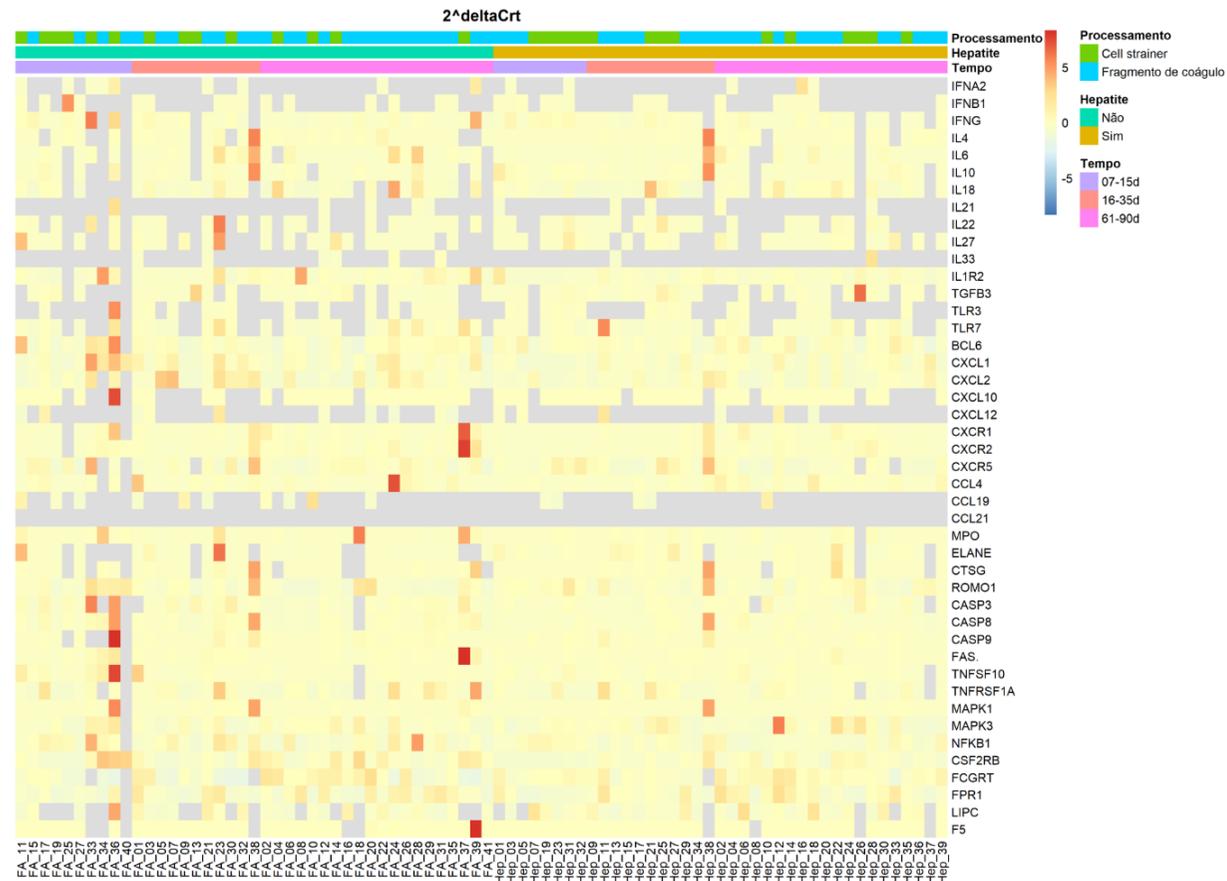


Gráfico dos dois primeiros componentes principais (PCA) para as amostras dos grupos FA 61-90d (verde) e Hep 61-90d (roxo), considerando os valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ de todos os genes analisados, exceto CCL21 e IL33. Fonte: elaborado pela autora.

Também não é possível observar separação entre os perfis de expressão dos marcadores dos grupos FA 61-90d e Hep 61-90d.

Adicionalmente, foi analisado o perfil de expressão de todos os genes, por meio da construção de um *heatmap* com os valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$ obtidos. Também foi avaliado se a expressão dos genes estava relacionada com o tempo após o início dos sintomas ou com a presença ou ausência de hepatite, além de possíveis vieses relacionados ao método de processamento das amostras (Gráfico 17).

Gráfico 17 – Padrões de expressão gênica dos genes analisados nas diferentes amostras



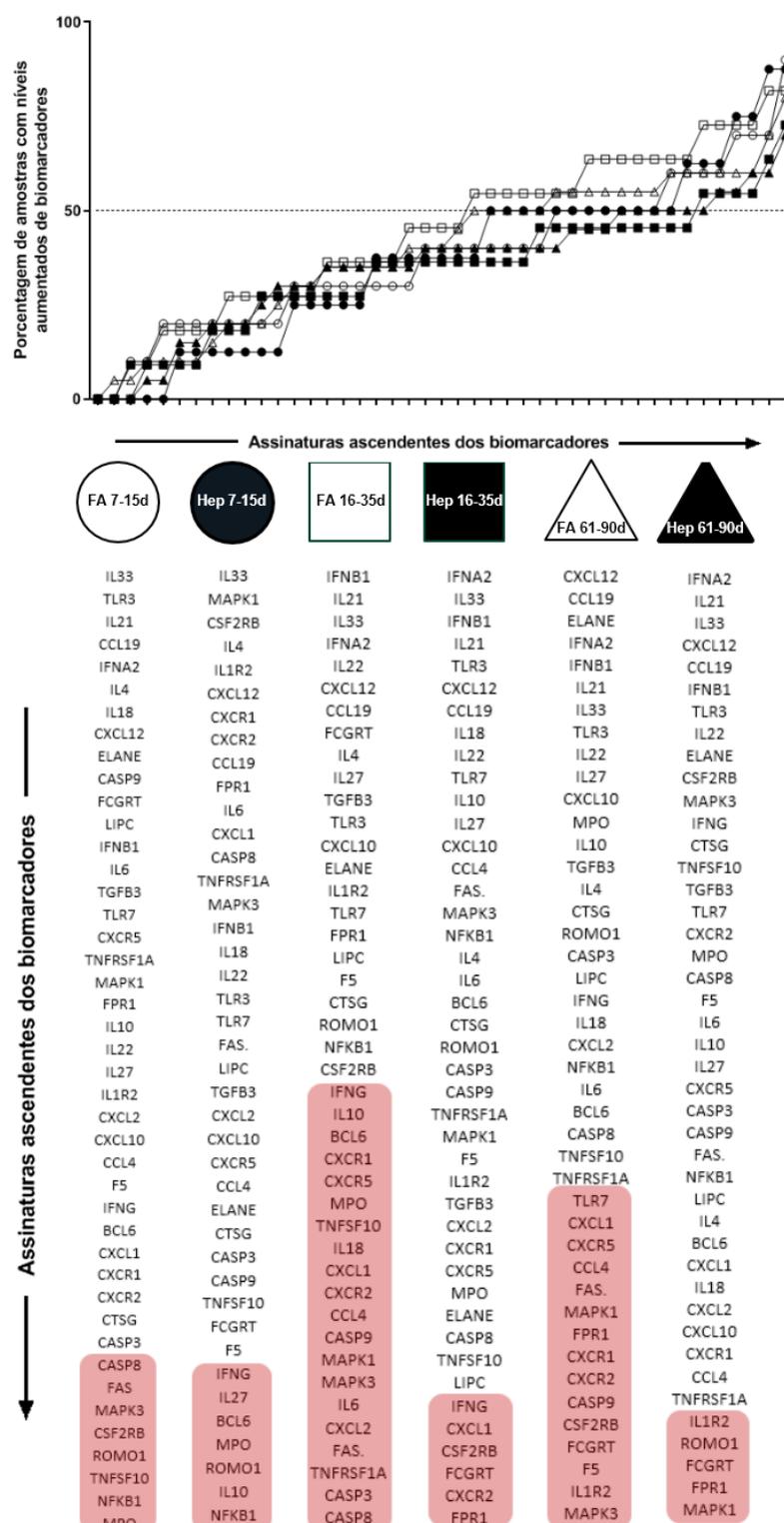
Perfil de expressão dos 44 genes analisados pelos valores de $2^{-\Delta Ct}$. O aumento de expressão está representado em vermelho, enquanto a diminuição da expressão está representada em azul (escala de cores variando de azul a vermelho). As linhas representam os genes e as colunas representam cada uma das amostras. As cores das barras superiores indicam as condições experimentais: (i) tipo de processamento da amostra, por *Cell strainer* (verde) ou fragmento de coágulo (azul); ou os grupos avaliados: (ii) presença (bege) ou ausência (verde água) de hepatite tardia; e (iii) tempo de coleta das amostras, 07-15 dias (lilás), 16-35 dias (laranja) ou 61-90 dias após início dos sintomas (rosa). Fonte: elaborado pela autora.

Foi possível observar que os indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados apresentam um perfil de expressão maior para alguns dos marcadores avaliados.

Alguns marcadores (IFNA2, IFNB1, IL21, IL33, TLR3, CXCL12, CCL19 e CCL21) não são expressos na maioria dos indivíduos dos grupos avaliados.

A fim de se avaliar quais os biomarcadores são mais expressos em cada grupo de pacientes avaliado, foi realizada uma análise de assinaturas ascendentes de biomarcadores com os valores de $2^{-\Delta C_{rt}}$, utilizando todos os genes (Gráfico 18).

Gráfico 18 – Análise da assinatura ascendente de biomarcadores



A mediana global dos valores de $2^{-\Delta C_t}$ para cada um dos genes foi utilizada para separação das amostras em altos e baixos respondedores. No gráfico estão plotadas as frequências (%) de altos respondedores em cada grupo: FA 07-15d (○), Hep 07-15d (●), FA 16-35d (□), Hep 16-35d (■), FA 61-90d (△) e Hep 61-90d (▲). A análise comparativa do perfil de biomarcadores entre os grupos foi realizada pela sobreposição das assinaturas ascendentes dos biomarcadores. Os quadros em vermelho destacam os genes acima do percentil 50 para cada grupo. Fonte: elaborado pela autora.

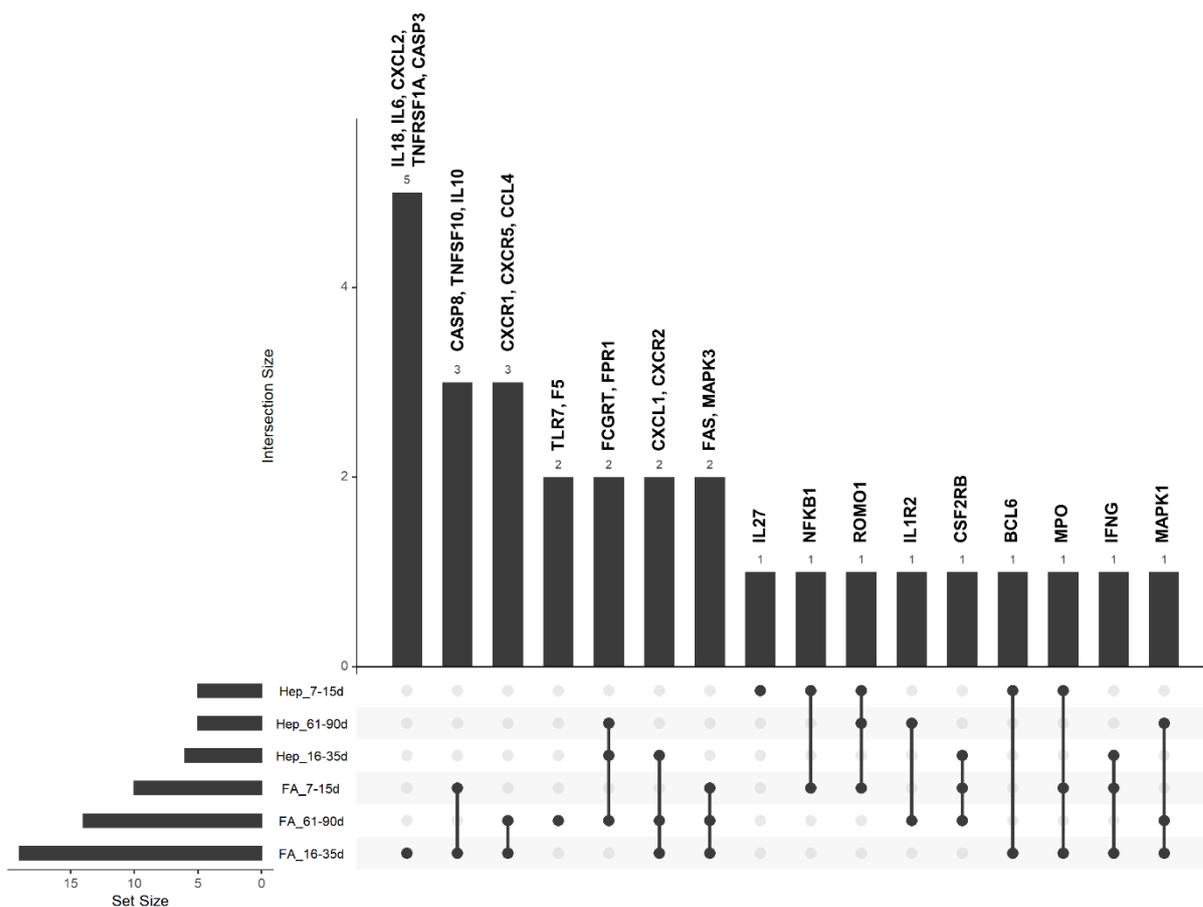
No estágio inicial após a fase aguda, foi possível observar maior frequência (acima do percentil 50) de CASP8, FAS, MAPK3, CSF2RB, ROMO1, TNFSF10, NFKB1 e MPO (em ordem crescente) no grupo de pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados (FA 07-15d). Já para o grupo de pacientes que apresentaram hepatite tardia (Hep 07-15d) foi possível observar maior frequência (acima do percentil 50) de IFNG, IL27, BCL6, MPO, ROMO1, IL10 e NFKB1 (em ordem crescente).

No estágio tardio após a fase aguda foi possível observar maior frequência de IFNG, IL10, BCL6, CXCR1, CXCR5, MPO, TNFSF10, IL18, CXCL1, CXCR2, CCL4, CASP9, MAPK1, MAPK3, IL6, CXCL2, FAS, TNFRSF1A, CASP3 e CASP8 (em ordem crescente) no grupo de pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados (FA 16-35d). Já no grupo dos indivíduos que apresentaram hepatite tardia (Hep 16-35d) foi possível observar maior frequência (acima do percentil 50) de IFNG, CXCL1, CSF2RB, FCGRT, CXCR2 e FPR1 (em ordem crescente).

No estágio de recidiva da doença (FA 61-90d), amostras de pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, têm maior frequência (acima do percentil 50) de TLR7, CXCL1, CXCR5, CCL4, FAS, MAPK1, FPR1, CXCR1, CXCR2, CASP9, CSF2RB, FCGRT, F5, IL1R2 e MAPK3 (em ordem crescente). E no grupo de pacientes que apresentaram hepatite tardia (Hep 61-90d) foi possível observar maior frequência (acima do percentil 50) de IL1R2, ROMO1, FCGRT, FPR1 e MAPK1 (em ordem crescente).

Para sumarizar os achados a partir da análise de assinatura ascendente de biomarcadores, foi realizada a construção de um gráfico UpSet com os biomarcadores de frequência superior a 50% em cada grupo (Gráfico 19).

Gráfico 19 – Gráfico UpSet dos biomarcadores com frequência maior que 50% nas diferentes grupos amostrais



No diagrama estão plotados os biomarcadores mais frequentes (frequência acima do percentil 50). As colunas, na parte superior do gráfico, indicam o número de biomarcadores em cada interseção e acima das colunas estão listados os respectivos biomarcadores. As linhas horizontais, na parte inferior do gráfico, indicam os grupos (Hep_7-15d, Hep_61-90d, Hep_16-35d, FA_7-15d, FA_61-90d e FA_16-35d), e as barras (à esquerda) indicam o número de biomarcadores presentes em cada grupo. Os pontos (●) indicam a quais grupos os biomarcadores pertencem, e as linhas (|) sinalizam a interseção entre os grupos nos quais os biomarcadores estão presentes. Fonte: elaborado pela autora.

NFKB1 foi o biomarcador mais frequente somente nos pacientes no estágio inicial após a fase aguda (07-15d) e está associado ao processo de produção de citocinas pró-inflamatórias e apoptose (KESSON & KING, 2001; KESSON *et al.*, 2002; BEST *et al.*, 2019).

IL1R2 foi o biomarcador mais frequente somente nos pacientes no estágio tardio após a fase aguda (61-90d) e está associado ao processo de produção de citocinas pró-inflamatórias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011).

IL18, IL6, CXCL2, TNFRSF1A, CASP3, CASP8, TNFSF10, IL10, CXCR1, CXCR5, CCL4, TLR7, F5, FAS e MAPK3 foram os biomarcadores mais frequentes somente

nas amostras do grupo controle (FA). Esses biomarcadores são associados aos processos de apoptose, morte celular hepática e produção de citocinas pró-inflamatórias (BYSTRY *et al.*, 2001; RAMANATHAN *et al.*, 2006; QUARESMA *et al.*, 2006; SCHNEIDER *et al.*, 2012; XU *et al.*, 2016; SREEKANTH *et al.*, 2018; VALERO *et al.*, 2019; DEGOTTARDI *et al.*, 2020; PRIKHOD'KO *et al.*, 2020), bem como de produção de citocinas anti-inflamatórias por meio da IL10 (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011) e ao reparo de tecidos em fígados lesionados, por meio da IL6 (GOH *et al.*, 2013).

IL27 foi o biomarcador mais frequente somente no grupo de pacientes que apresentaram hepatite tardia no estágio inicial após a fase aguda (Hep 07-15d). IL27 apresenta perfil anti-inflamatório, mas pode desencadear resposta pró-inflamatória quando ativado juntamente com IL12 (FRANK *et al.*, 2010; SCOTTO *et al.*, 2011; APARICIO-SIEGMUND & GARBERS, 2015).

IL18, IL6, CXCL2, TNFRSF1A e CASP3 foram os biomarcadores mais frequentes somente no grupo de pacientes curados, no estágio tardio após a fase aguda (FA 16-35d). Esses biomarcadores estão envolvidos com processos de apoptose e produção de citocinas pró-inflamatórias (DE OLIVEIRA *et al.*, 2011; SCHNEIDER *et al.*, 2012; VALERO *et al.*, 2019; PRIKHOD'KO *et al.*, 2020; BEROSKE *et al.*, 2021; YAN, Q., *et al.*, 2021), porém IL6 está envolvida com o reparo de tecidos e proliferação de hepatócitos em fígados lesionados (GOH *et al.*, 2013).

TLR7 e F5 foram os biomarcadores mais frequentes somente no grupo de pacientes que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, no estágio de recidiva da doença (FA 61-90d). Esses biomarcadores estão envolvidos com processos de recrutamento de células NK e células dendríticas, e na cascata de coagulação (MANN & KALAFATIS, 2003; ASSELTA *et al.*, 2006; LAUZON *et al.*, 2006; NEVES *et al.*, 2009).

Posteriormente foram avaliadas as vias associadas aos perfis de expressão gênica utilizando os valores das medianas de $2^{-\Delta Ct}$ por gene em cada grupo no programa MetaCore. O grupo FA 61-90d foi utilizado como referência (valor 1), e a expressão dos demais grupos foi calculada em relação a ele.

Na Figura 8 está representada a via de “resposta imunológica – papel da proteína

por estresse é a via metabólica mais representativa que engloba o maior número de genes selecionados para o estudo (CASP3, CASP8, IFNA2, IFNB1, IFNG, IL6, IL10, MAPK1, MAPK3, NFKB1, TLR3 e TNFRSF1A), e é caracterizada pela indução de apoptose celular e resposta de IFNs, por meio da PKR, após estresse promovido por infecções virais, a fim de restaurar a homeostase celular (DABO & MEURS, 2012; PAKOS-ZEBRUCKA *et al.*, 2016; CESARO & MICHIELS, 2021).

6 CONCLUSÃO

Os marcadores CASP3, CASP8, CXCR1, IL18, MAPK3, FAS e FCGRT foram diferentemente expressos entre indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados, nos estágios iniciais (FA 07-15d) e tardios (FA 16-35d) após a fase aguda, quando comparados aos indivíduos que apresentaram hepatite de recidiva tardia, nas mesmas fases (Hep 07-15 e 16-35d), indicando que podem ser potenciais biomarcadores de prognóstico.

É possível observar uma maior discrepância nos perfis de expressão dos marcadores entre os indivíduos dos grupos FA 07-15d e Hep 07-15d.

Além disso, as análises de assinaturas ascendentes de biomarcadores permitiram a identificação de um perfil de biomarcadores envolvidos em resposta mais pró-inflamatória (IL18, CXCL2, TNFRSF1A, CASP3, CASP8, TNFSF10, IL10, CXCR1, CXCR5, CCL4, TLR7, F5, FAS e MAPK3) em indivíduos que apresentaram febre amarela e foram efetivamente curados. Porém, há também perfil de reparo de danos hepáticos nesses indivíduos, no estágio tardio após a fase aguda (FA 16-35d), por meio da IL6.

Para pacientes que apresentaram hepatite tardia, no estágio inicial após a fase aguda (Hep 07-15d), foi observado um perfil de expressão mais regulador, por meio da IL27.

IL27 é um potencial biomarcador de prognóstico de desfecho de hepatite de recidiva tardia, enquanto IL18, CXCL2, TNFRSF1A, CASP3, CASP8, TNFSF10, IL10, CXCR1, CXCR5, CCL4, TLR7, F5, FAS, MAPK3 e IL6 são potenciais biomarcadores de prognóstico de possível não desenvolvimento de hepatite tardia, após infecção por febre amarela.

7 PERSPECTIVAS

- Obter amostras de sangue de pacientes do surto de 2016-2017 e analisá-las utilizando TaqMan® Array Cards;
- Extrair DNA das amostras de sangue de pacientes do surto de 2016-2017 e realizar ensaios para verificação da frequência de SNPs possivelmente relacionados com hepatite de recidiva tardia nos pacientes dos dois surtos;
- Correlacionar os dados clínicos, de expressão gênica, carga viral, SNPs e fatores solúveis para uma avaliação global dos fatores determinantes dos desfechos clínicos dos pacientes com febre amarela.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABUTALEB, A.; KOTTILIL, S. Hepatitis A: Epidemiology, Natural History, Unusual Clinical Manifestations, and Prevention. **Gastroenterology clinics of North America**, v. 49, n. 2, p. 191–199, 2020.
- AL-AOUKATY, A., *et al.* MIP-3alpha, MIP-3beta and fractalkine induce the locomotion and the mobilization of intracellular calcium, and activate the heterotrimeric G proteins in human natural killer cells. **Immunology**, v. 95, n. 4, p. 618–624, 1998.
- ALBARNAZ, J. D., *et al.* MEK/ERK activation plays a decisive role in yellow fever virus replication: implication as an antiviral therapeutic target. **Antiviral research**, v. 111, p. 82–92, 2014.
- ALONSO-PALOMARES, L. A., *et al.* Molecular Basis for Arbovirus Transmission by *Aedes aegypti* Mosquitoes. **Intervirolgy**, v. 61, n. 6, p. 255–264, 2018.
- ALTO, B. W.; LORD, C. C. Transstadial Effects of Bti on Traits of *Aedes aegypti* and Infection with *Dengue Virus*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 10, n. 2, p. e0004370, 2016.
- ANDERSEN, C. L., *et al.* Normalization of real-time quantitative reverse transcription-PCR data: a model-based variance estimation approach to identify genes suited for normalization, applied to bladder and colon cancer data sets. **Cancer research**, v. 64, n. 15, p. 5245–5250, 2004.
- ANDRADE, R. J., *et al.* Drug-induced liver injury. **Nature reviews. Disease primers**, v. 5, n. 1, p. 58, 2019.
- APARICIO-SIEGMUND, S.; GARBERS, C. The biology of interleukin-27 reveals unique pro- and anti-inflammatory functions in immunity. **Cytokine & growth factor reviews**, v. 26, n. 5, p. 579–586, 2015.
- ASSELTA, R., *et al.* Inherited defects of coagulation factor V: the hemorrhagic side. **Journal of thrombosis and haemostasis: JTH**, v. 4, n. 1, p. 26–34, 2006.
- BAI, F., *et al.* A paradoxical role for neutrophils in the pathogenesis of West Nile virus. **The journal of infectious diseases**, v. 202, n. 12, p. 1804–1812, 2010.
- BARBER, R. D., *et al.* GAPDH as a housekeeping gene: analysis of GAPDH mRNA expression in a panel of 72 human tissues. **Physiological genomics**, v. 21, n. 3, p. 389–395, 2005.
- BARBOSA, C. M., *et al.* Yellow Fever Virus RNA in Urine and Semen of Convalescent Patient, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 24, n. 1, 2018.
- BARRETT, A. D. & MONATH, T. P. (2003). Epidemiology and ecology of yellow fever. **Advances in Virus Research**, v. 61, p. 291–315, 2003.
- BATOOL, K.; *et al.* Transcriptomic Analysis of *Aedes aegypti* in Response to Mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* LLP29 Toxin. **Scientific reports**, v. 8, n. 1, p. 12650, 2018.
- BELÁK, S., *et al.* Detection of pseudorabies virus DNA sequences by the polymerase chain reaction. **Archives of virology**, v. 108, n. 3–4, p. 279–286, 1989.
- BEROSKE, L., *et al.* Molecular Imaging of Apoptosis: The Case of Caspase-3

Radiotracers. **International journal of molecular sciences**, v. 22, n. 8, p. 3948, 2021.

BEST, K. T., *et al.* Deletion of NFKB1 enhances canonical NF- κ B signaling and increases macrophage and myofibroblast content during tendon healing. **Scientific reports**, v. 9, n. 1, p. 10926, 2019.

BONACCHI, A., *et al.* The chemokine CCL21 modulates lymphocyte recruitment and fibrosis in chronic hepatitis C. **Gastroenterology**, v. 125, n. 4, p. 1060–1076, 2003.

BOSIO, C. F., *et al.* Quantitative Trait Loci That Control Vector Competence for *Dengue-2 Virus* in the Mosquito *Aedes aegypti*. **Genetics**, v. 156, n. 2, p. 687–698, 2000.

BRAND, S., *et al.* IL-22 is increased in active Crohn's disease and promotes proinflammatory gene expression and intestinal epithelial cell migration. **American journal of physiology. Gastrointestinal and liver physiology**, v. 290, n. 4, p. G827-38, 2006.

BRAVO, A., *et al.* Mode of action of *Bacillus thuringiensis* Cry and Cyt toxins and their potential for insect control. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 49, n. 4, p. 423–435, 2007.

BRINKMANN, V., *et al.* Neutrophil extracellular traps kill bacteria. **Science**, v. 303, n. 5663, p. 1532–1535, 2004.

BROWN, J. E., *et al.* Human impacts have shaped historical and recent evolution in *Aedes aegypti*, the dengue and yellow fever mosquito. **Evolution; international journal of organic evolution**, v. 68, n. 2, p. 514–525, 2014.

BYSTRY, R., *et al.* B cells and professional APCs recruit regulatory T cells via CCL4. **Nature immunology**, v. 2, n. 12, p. 1126–1132, 2001.

CAMPI-AZEVEDO, A. C., *et al.* Booster dose after 10 years is recommended following 17DD-YF primary vaccination. **Human vaccines & immunotherapeutics**, v. 12, n. 2, p. 491–502, 2016.

CAMPI-AZEVEDO, A. C., *et al.* 17DD Yellow Fever Revaccination and Heightened Long-Term Immunity in Populations of Disease-Endemic Areas, Brazil. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 8, p. 1511–1521, 2019.

CASADIO, L. V. B., *et al.* Lipase and factor V (but not viral load) are prognostic factors for the evolution of severe yellow fever cases. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 114, n. 0, p. e190033, 2019.

CASTRO, F., *et al.* Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. **Frontiers in immunology**, v. 9, 2018.

CAVALCANTE, K. R.; TAUIL, P.L. Epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil, 2000-2012. **Epidemiologia e servicos de saude: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 25, n. 1, p. 11–20, 2016.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Prevention of Yellow Fever. Atlanta, USA; 2019c. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/prevention/index.html>. Acesso em 01 abr 2020.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Symptoms, Diagnosis, & Treatment. Atlanta, USA; 2019b. Disponível em:

<https://www.cdc.gov/yellowfever/symptoms/index.html>. Acesso em 23 mar 2020.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Transmission of *Yellow Fever Virus*. Atlanta, USA; 2019a. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/transmission/index.html>. Acesso em 19 mar 2020.

CDC - CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Yellow Fever Vaccine. Atlanta, USA; 2020. Disponível em: <https://www.cdc.gov/yellowfever/vaccine/index.html>. Acesso em 28 mar 2020.

CESARO, T.; MICHIELS, T. Inhibition of PKR by Viruses. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 757238, 2021.

CHATTERJEE, C.; SPARKS, D. L. Hepatic Lipase, High Density Lipoproteins, and Hypertriglyceridemia. **The American journal of pathology**, v. 178, n. 4, p. 1429–1433, 2011.

CHEN, X., *et al.* The role of CXCL chemokine family in the development and progression of gastric cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 13, n. 3, p. 484–492, 2020.

CHENG, F., *et al.* Suppression of Zika Virus Infection and Replication in Endothelial Cells and Astrocytes by PKA Inhibitor PKI 14-22. **Journal of virology**, v. 92, n. 4, p. JVI.02019-17, 2018.

CHENG, N. L., *et al.* MicroRNA-125b modulates inflammatory chemokine CCL4 expression in immune cells and its reduction causes CCL4 increase with age. **Ageing cell**, v. 14, n. 2, p. 200–208, 2015.

CHENG, Y. L., *et al.* Dengue Virus Infection Causes the Activation of Distinct NF- κ B Pathways for Inducible Nitric Oxide Synthase and TNF- α Expression in RAW264.7 Cells. **Mediators of inflammation**, v. 2015, p. 274025, 2015.

CHUNG, Y. M., *et al.* A novel protein, Romo1, induces ROS production in the mitochondria. **Biochemical and biophysical research communications**, v. 347, n. 3, p. 649–655, 2006.

COCCHI, F., *et al.* Identification of RANTES, MIP-1 alpha, and MIP-1 beta as the major HIV-suppressive factors produced by CD8⁺ T cells. **Science**, v. 270, n. 5243, p. 1811–1815, 1995.

COLLABORATIVE GROUP FOR STUDIES ON YELLOW FEVER VACCINES. Duration of post-vaccination immunity against yellow fever in adults. **Vaccine**, v. 32, n. 39, p. 4977–4984, 2014.

COLLINS, M. H.; METZ, S. W. Progress and Works in Progress: Update on Flavivirus vaccine Development. **Clinical therapeutics**, v. 39, n. 8, p. 1519–1536, 2017.

DABO, S.; MEURS, E. F. dsRNA-dependent protein kinase PKR and its role in stress, signaling and HCV infection. **Viruses**, v. 4, n. 11, p. 2598–2635, 2012.

DAVID, S.; HAMILTON, J. P. Drug-induced Liver Injury. **US gastroenterology & hepatology review**, v. 6, p. 73–80, 2010.

DE OLIVEIRA, C. M., *et al.* Cytokines and pain. **Revista brasileira de anesthesiologia**, v. 61, n. 2, p. 255–9, 260–5, 137–42, 2011.

DEGOTTARDI, Q., *et al.* Ontogeny of different subsets of yellow fever virus-specific

- circulatory CXCR5⁺ CD4⁺ T cells after yellow fever vaccination. **Scientific reports**, v. 10, n. 1, p. 15686, 2020.
- DELVES, P. J.; ROITT, I. M. The Immune System. **The New England journal of medicine**, v. 343, n. 1, p. 37–49, 2000.
- DENIS, B., *et al.* Hepatitis Rebound after Infection with *Yellow Fever Virus*. **Emerging infectious diseases**, v. 25, n. 6, p. 1248–1249, 2019.
- DONG, S., *et al.* *Chikungunya virus* dissemination from the midgut of *Aedes aegypti* is associated with temporal basal lamina degradation during bloodmeal digestion. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 11, n. 9, p. e0005976, 2017.
- EBERHARD, Y., *et al.* Up-regulation of the chemokine CCL21 in the skin of subjects exposed to irritants. **BMC immunology**, v. 5, p. 7, 2004.
- FERNANDEZ-GARCIA, M. D., *et al.* Pathogenesis of *Flavivirus* Infections: Using and Abusing the Host Cell. **Cell host & microbe**, v. 5, n. 4, p. 318–328, 2009.
- FONTOURA, M. A., *et al.* Neutrophil Recruitment and Participation in Severe Diseases Caused by Flavivirus Infection. **Life**, v. 11, n. 7, p. 717, 2021.
- FRANCA, R. F., *et al.* IL-33 signaling is essential to attenuate viral-induced encephalitis development by downregulating iNOS expression in the central nervous system. **Journal of neuroinflammation**, v. 13, n. 1, 2016.
- FRANCESCHI, C.; CAMPISI, J. Chronic inflammation (inflammaging) and its potential contribution to age-associated diseases. **The journals of gerontology. Series A, Biological sciences and medical sciences**, v. 69 Suppl 1, n. Suppl 1, p. S4-9, 2014.
- FRANCIS, T. I., *et al.* A clinicopathological study of human yellow fever. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 46, n. 5, p. 659–667, 1972.
- FRANK, A. C., *et al.* Interleukin-27, an anti-HIV-1 cytokine, inhibits replication of hepatitis C virus. **Journal of interferon & cytokine research**, v. 30, n. 6, p. 427–431, 2010.
- FREITAS, C. S., *et al.* *Yellow fever virus* is susceptible to sofosbuvir both *in vitro* and *in vivo*. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 13, n. 1, p. e0007072, 2019.
- GALLE, P. R., *et al.* Involvement of the CD95 (APO-1/Fas) receptor and ligand in liver damage. **The journal of experimental medicine**, v. 182, n. 5, p. 1223–1230, 1995.
- GARDNER, C. L.; RYMAN, K. D. Yellow Fever: A Reemerging Threat. **Clinics in laboratory medicine**, v. 30, n. 1, p. 237–260, 2010.
- GEMPERLE, C., *et al.* Regulation of the formyl peptide receptor 1 (FPR1) gene in primary human macrophages. **PLoS one**, v. 7, n. 11, p. e50195, 2012.
- GHOSH, R. S., *et al.* Regulation of cell survival and death during Flavivirus infections. **World journal of biological chemistry**, v. 5, n. 2, p. 93–105, 2014.
- GOH, Y. P., *et al.* Eosinophils secrete IL-4 to facilitate liver regeneration. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 110, n. 24, p. 9914–9919, 2013.
- GOLDANI, L. Z. Yellow fever outbreak in Brazil, 2017. **The Brazilian journal of**

infectious diseases, v. 21, n. 2, p. 123–124, 2017.

GUAN, E., *et al.* Natural Truncation of the Chemokine MIP-1 β /CCL4 Affects Receptor Specificity but Not Anti-HIV-1 Activity. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 35, p. 32348–32352, 2002.

GUICCIARDI, M. E.; GORES, G. J. Life and death by death receptors. . **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 23, n. 6, p. 1625–1637, 2009.

HAMER, D. H., *et al.* Fatal yellow fever in travelers to Brazil, 2018. **MMWR. Morbidity and mortality weekly report**, v. 67, n. 11, p. 340–341, 2018.

HERPIN, A., *et al.* Transforming growth factor-beta-related proteins: an ancestral and widespread superfamily of cytokines in metazoans. **Developmental and comparative immunology**, v. 28, n. 5, p. 461–485, 2004.

HINDLE, E. Yellow Fever: an Epidemiological and Historical Study of its Place of Origin. **Nature**, v. 130, n. 3287, p. 646–647, 1932.

HO, Y. L., *et al.* Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. **Journal of travel medicine**, v. 26, n. 5, 2019.

HOGUE, J., *et al.* IL-6 controls the innate immune response against *Listeria monocytogenes* via classical IL-6 signaling. **The journal of immunology**, v. 190, n. 2, p. 703–711, 2013.

HOLANDA, G. M., *et al.* Yellow fever virus modulates cytokine mRNA expression and induces activation of caspase 3/7 in the human hepatocarcinoma cell line HepG2. **Archives of virology**, v. 164, n. 4, p. 1187–1192, 2019.

HOLFORD, N. C., *et al.* Stability of beta-actin mRNA in plasma. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1137, n. 1, p. 108–111, 2008.

IMAIZUMI, T., *et al.* Toll-like receptor 3 signaling contributes to the expression of a neutrophil chemoattractant, CXCL1 in human mesangial cells. **Clinical and experimental nephrology**, v. 19, n. 5, p. 761–770, 2015.

IVANOV, A. V., *et al.* HCV and oxidative stress in the liver. **Viruses**, v. 5, n. 2, p. 439–469, 2013.

JANSEN, H., *et al.* Hepatic lipase: a pro- or anti-atherogenic protein? **Journal of Lipid Research**, v. 43, n. 9, p. 1352–1362, 2002.

JIANG, M., *et al.* The Connections Between Neural Crest Development and Neuroblastoma. **Current topics in developmental biology**, v. 94, p. 77–127, 2011.

JOSSE, J.; HUSSON, F. missMDA: A Package for Handling Missing Values in Multivariate Data Analysis. **Journal of statistical software**, v. 70, n. 1, 2016.

KALLAS, E. G., *et al.* Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. **The Lancet infectious diseases**, v. 19, n. 7, p. 750–758, 2019.

KAM, Y. W., *et al.* Zika-Unicamp Network. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. **The journal of infectious diseases**, v. 216, n. 2, p. 172–181, 2017.

- KANDIL, E., *et al.* The human gene encoding the heavy chain of the major histocompatibility complex class I-like Fc receptor (FCGRT) maps to 19q13.3. **Cytogenetics and cell genetics**, v. 73, n. 1–2, p. 97–98, 1996.
- KAPUSHESKY, M., *et al.* Gene expression atlas at the European bioinformatics institute. **Nucleic acids research**, v. 38, n. Database issue, p. D690-8, 2010.
- KESSON, A. M., *et al.* Regulation of immune recognition molecules by flavivirus, West Nile. **Viral immunology**, v. 15, n. 2, p. 273–283, 2002.
- KESSON, A. M.; KING, N. J. Transcriptional regulation of major histocompatibility complex class I by flavivirus West Nile is dependent on NF-kappaB activation. **The journal of infectious diseases**, v. 184, n. 8, p. 947–954, 2001.
- KUCHIPUDI, S. V., *et al.* 18S rRNA is a reliable normalisation gene for real time PCR based on influenza virus infected cells. **Virology journal**, v. 9, n. 1, p. 230, 2012.
- KUNDER, M., *et al.* Plasma Neutrophil Elastase, α_1 -Antitrypsin, α_2 -Macroglobulin and Neutrophil Elastase- α_1 -Antitrypsin Complex Levels in patients with Dengue Fever. **Indian journal of clinical biochemistry: IJCB**, v. 33, n. 2, p. 218–221, 2018.
- KUO, T. T., *et al.* Neonatal Fc receptor: from immunity to therapeutics. **Journal of clinical immunology**, v. 30, n. 6, p. 777–789, 2010.
- LAM, L. K. M., *et al.* Gamma-interferon exerts a critical early restriction on replication and dissemination of yellow fever virus vaccine strain 17D-204. **NPJ vaccines**, v. 3, p. 5, 2018.
- LAUZON, N. M., *et al.* The direct effects of Toll-like receptor ligands on human NK cell cytokine production and cytotoxicity. **Cellular immunology**, v. 241, n. 2, p. 102–112, 2006.
- LAZEAR, H. M. *et al.* Shared and Distinct Functions of Type I and Type III Interferons. **Immunity**, v. 50, n. 4, p. 907–923, 2019.
- LINDENBACH, B. D., *et al.* *Flaviviridae*. In: Fields Virology. 6th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, p. 712- 746, 2001.
- LISBONNE, M., *et al.* Invariant natural killer T-cell-deficient mice display increased CCl₄-induced hepatitis associated with CXCL1 over-expression and neutrophil infiltration. **European journal of immunology**, v. 41, n. 6, p. 1720–1732, 2011.
- LITVOC, M. N., *et al.* Yellow fever. **Revista da Associacao Medica Brasileira (1992)**, v. 64, n. 2, p. 106–113, 2018.
- LIU, M., *et al.* G protein-coupled receptor FPR1 as a pharmacologic target in inflammation and human glioblastoma. **International immunopharmacology**, v. 14, n. 3, p. 283–288, 2012.
- LIU, W., *et al.* Hepatitis B virus core protein inhibits Fas-mediated apoptosis of hepatoma cells via regulation of mFas/FasL and sFas expression. **FASEB journal: official publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 29, n. 3, p. 1113–1123, 2015.
- LIU, W., *et al.* Identification and Functional Analysis of the Rat Caspase-3 Gene Promoter. **The journal of biological chemistry**, v. 277, n. 10, p. 8273–8278, 2002.
- LIVAK, K.J.; SCHMITTGEN, T.D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. **Methods**, v. 25, n.

4, p. 402–408, 2001.

LOSSOS, I. S., *et al.* The *BCL6* gene in B-cell lymphomas with 3q27 translocations is expressed mainly from the rearranged allele irrespective of the partner gene. **Leukemia**, v. 17, n. 7, p. 1390–1397, 2003.

LU, X., *et al.* Double Lock of a Human Neutralizing and Protective Monoclonal Antibody Targeting the *Yellow Fever Virus* Envelope. **Cell reports**, v. 26, n. 2, p. 438–446.e5, 2019.

MACKENZIE, J. S., *et al.* Emerging flaviviruses: the spread and resurgence of Japanese encephalitis, West Nile and dengue viruses. **Nature medicine**, v. 10, n. 12 Suppl, p. S98–109, 2004.

MALEFYT, R. W., *et al.* Interleukin 10(IL-10) inhibits cytokine synthesis by human monocytes: an autoregulatory role of IL-10 produced by monocytes. **The journal of experimental medicine**, v. 174, n. 5, p. 1209–1220, 1991.

MANCILLA-GALINDO, J.; GALINDO-SEVILLA, N. Exploring the rationale for thermotherapy in COVID-19. **International journal of hyperthermia: the official journal of European Society for Hyperthermic Oncology, North American Hyperthermia Group**, v. 38, n. 1, p. 202–212, 2021.

MANN, K. G.; KALAFATIS, M. Factor V: a combination of Dr Jekyll and Mr Hyde. **Blood**, v. 101, n. 1, p. 20–30, 2003.

MARQUES, R. E., *et al.* Interleukin-33 contributes to disease severity in Dengue virus infection in mice. **Immunology**, v. 155, n. 4, p. 477–490, 2018.

MARSLAND, B. J., *et al.* CCL19 and CCL21 Induce a Potent Proinflammatory Differentiation Program in Licensed Dendritic Cells. **Immunity**, v. 22, n. 4, p. 493–505, 2005.

MARTINS, M. A., *et al.* Innate immunity phenotypic features point toward simultaneous raise of activation and modulation events following 17DD live attenuated yellow fever first-time vaccination. **Vaccine**, v. 26, n. 9, p. 1173–1184, 2008.

MICHLMAYR, D.; LIM, J. K. Chemokine receptors as important regulators of pathogenesis during arboviral encephalitis. **Frontiers in cellular neuroscience**, v. 8, p. 264, 2014.

MIGLIAZZA, A., *et al.* Frequent somatic hypermutation of the 5' noncoding region of the *BCL6* gene in B-cell lymphoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 92, n. 26, p. 12520–12524, 1995.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Combate ao *Aedes Aegypti*: prevenção e controle da Dengue, Chikungunya e Zika. Brasília, DF; 2020b. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/aedes-aegypti>. Acesso em 02 abr 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Febre amarela: sintomas, tratamento, diagnóstico e prevenção. Brasília, DF; 2020a. Disponível em: <http://saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-amarela-sintomas-transmissao-e-prevencao>. Acesso em 28 mar 2020.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Ciência, Tecnologia e Insumos Estratégicos. Classificação de Risco dos Agentes Biológicos. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. ISBN 978-85-334-2547-7.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Informe – Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela Brasil – 2017/2018. nº 27. Brasília: Ministério da Saúde; 2018b.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Situação epidemiológica da febre amarela no monitoramento 2019/2020. Volume 51 - nº 01. Brasília: Ministério da Saúde; 2020c. ISSN 9352-7864.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Febre amarela: guia para profissionais de saúde / Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2018a. 67 p.: il. ISBN 978-85-334-2480-7.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico - Vigilância Epidemiológica da Febre Amarela e a importância da preparação para o monitoramento do período sazonal, Brasil, 2014-2015. Volume 46 - nº 23. Brasília: Ministério da Saúde; 2015. ISSN 2358-9450.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Boletim Epidemiológico – Emergência epidemiológica de febre amarela no Brasil, no período de dezembro de 2016 a julho de 2017b. Volume 48 - nº 28. Brasília: Ministério da Saúde; 2017. ISSN 2358-9450.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Manual de manejo clínico da febre amarela. 1. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2020d. ISBN 978-85-334-2818-8.

MINISTÉRIO DA SAÚDE (Brasil). Secretaria de Vigilância em Saúde. Hepatites virais: o Brasil está atento / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde. 3. ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2008. 60 p.: il. ISBN 978-85-334-1461-7.

MLERA, L., *et al.* The role of viral persistence in flavivirus biology. **Pathogens and disease**, v. 71, n. 2, p. 137–163, 2014.

MONATH, T. P. Treatment of yellow fever. **Antiviral research**, v. 78, n. 1, p. 116–124, 2008.

MONATH, T. P. Yellow fever: an update. **The Lancet infectious diseases**, v. 1, n. 1, p. 11–20, 2001.

MORI, R., *et al.* Both beta-actin and GAPDH are useful reference genes for normalization of quantitative RT-PCR in human FFPE tissue samples of prostate cancer. **The prostate**, v. 68, n. 14, p. 1555–1560, 2008.

MULLIS, K. B.; FALOONA, F. A. Specific synthesis of DNA *in vitro* via a polymerase-catalyzed chain reaction. **Methods in enzymology**, v. 155, p. 335–350, 1987.

MUTEBI, J.-P. & BARRETT, A. D. The epidemiology of yellow fever in Africa. **Microbes and infection**, v. 4, n. 14, p. 1459–1468, 2002.

NEVES, P. C., *et al.* TLR expression and NK cell activation after human yellow fever vaccination. **Vaccine**, v. 27, n. 41, p. 5543–5549, 2009.

NGONO, A. E.; SHRESTA, S. Immune Response to Dengue and Zika. **Annual Review of Immunology**, v. 36, n. 1, p. 279–308, 2018.

NOH, J.-Y., *et al.* Toll-Like Receptors in Natural Killer Cells and Their Application for

- Immunotherapy. **Journal of immunology research**, v. 2020, p. 2045860, 2020.
- NURIEVA, R. I., *et al.* Bcl6 Mediates the Development of T Follicular Helper Cells. **Science**, v. 325, n. 5943, p. 1001–1005, 2009.
- NYSTRÖM, K., *et al.* Real time PCR for monitoring regulation of host gene expression in herpes simplex virus type 1-infected human diploid cells. **Journal of virological methods**, v. 118, n. 2, p. 83–94, 2004.
- O'BRIEN, S. A., *et al.* The Importance of IL-6 in the Development of LAT-Mediated Autoimmunity. **The journal of immunology**, v. 195, n. 2, p. 695–705, 2015.
- OGASAWARA, J., *et al.* Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. **Nature**, v. 364, n. 6440, p. 806–809, 1993.
- OKAMOTO, T., *et al.* Regulation of Apoptosis during Flavivirus Infection. **Viruses**, v. 9, n. 9, p. 243, 2017.
- OLIOSI, E. *et al.* Yellow fever in two unvaccinated French tourists to Brazil, January and March, 2018. **Euro surveillance**, v. 23, n. 21, 2018.
- OLSSON, M. L., *et al.* A clinically applicable method for determining the three major alleles at the Duffy (*FY*) blood group locus using polymerase chain reaction with allele-specific primers. **Transfusion**, v. 38, n. 2, p. 168–173, 1998.
- OPAS - ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DA SAÚDE. Folha informativa – Febre Amarela. Brasília (DF): OPAS/OMS; 2019. Disponível em: https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5578:folha-informativa-febre-amarela&Itemid=875. Acesso em 02 abr 2020.
- OSÓRIO, F. M. F., *et al.* Hepatitis Relapse after Yellow Fever Infection: Is There Another Wave? **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 53, p. e20200152, 2020.
- PAKOS-ZEBRUCKA, K., *et al.* The integrated stress response. **EMBO reports**, v. 17, n. 10, p. 1374–1395, 2016.
- PAN, Y., *et al.* The Dual Regulation of Apoptosis by Flavivirus. **Frontiers in microbiology**, v. 12, p. 654494, 2021.
- PARK, A.; IWASAKI, A. Type I and Type III Interferons – Induction, Signaling, Evasion, and Application to Combat COVID-19. **Cell host & microbe**, v. 27, n. 6, p. 870–878, 2020.
- PICKENS, S. R., *et al.* Characterization of CCL19 and CCL21 in rheumatoid arthritis. **Arthritis and rheumatism**, v. 63, n. 4, p. 914–922, 2011.
- PIQUERAS, B., *et al.* Upon viral exposure, myeloid and plasmacytoid dendritic cells produce 3 waves of distinct chemokines to recruit immune effectors. **Blood**, v. 107, n. 7, p. 2613–2618, 2006.
- POSSAS, C., *et al.* Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 113, n. 10, p. e180278, 2018.
- PRESTWOOD, T. R., *et al.* Gamma interferon (IFN- γ) receptor restricts systemic dengue virus replication and prevents paralysis in IFN- α/β receptor-deficient mice. **Journal of virology**, v. 86, n. 23, p. 12561–12570, 2012.

- PRIKHOD'KO, G. G., *et al.* Langat Flavivirus Protease NS3 Binds Caspase-8 and Induces Apoptosis. **Journal of virology**, v. 76, n. 11, p. 5701–5710, 2002.
- PRUSZYNSKI, C. A., *et al.* A Large Scale Biorational Approach Using *Bacillus thuringiensis israeliensis* (Strain AM65-52) for Managing *Aedes aegypti* Populations to Prevent Dengue, Chikungunya and Zika Transmission. **PLoS one**, v. 12, n. 2, p. e0170079, 2017.
- QUARESMA, J. A. S., *et al.* Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. **Virus research**, v. 116, n. 1–2, p. 91–97, 2006.
- QUARESMA, J. A. S., *et al.* Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. **Reviews in medical virology**, v. 23, n. 5, p. 305–318, 2013.
- RADAEVA, S., *et al.* Interleukin 22 (IL-22) plays a protective role in T cell-mediated murine hepatitis: IL-22 is a survival factor for hepatocytes via STAT3 activation. **Hepatology**, v. 39, n. 5, p. 1332–1342, 2004.
- RADONIĆ, A. *et al.* Reference gene selection for quantitative real-time PCR analysis in virus infected cells: SARS corona virus, Yellow fever virus, Human Herpesvirus-6, Camel pox virus and Cytomegalovirus infections. **Virology journal**, v. 2, n. 1, p. 7, 2005.
- RAMANATHAN, M. P., *et al.* Host cell killing by the West Nile Virus NS2B–NS3 proteolytic complex: NS3 alone is sufficient to recruit caspase-8-based apoptotic pathway. **Virology**, v. 345, n. 1, p. 56–72, 2006.
- RATCLIFF, R. M., *et al.* Molecular diagnosis of medical viruses. **Current issues in molecular biology**, v. 9, n. 2, p. 87–102, 2007.
- REZENDE, I. M., *et al.* Late-Relapsing Hepatitis after Yellow Fever. **Viruses**, v. 12, n. 2, p. 222, 2020.
- REZZA, G. Dengue and other *Aedes*-borne viruses: a threat to Europe? **Euro surveillance**, v. 21, n. 21, 2016.
- ROJAS, J. M., *et al.* IL-10: A Multifunctional Cytokine in Viral Infections. **Journal of immunology research**, v. 2017, p. 6104054, 2017.
- ROMANO, A. P.M., *et al.* Febre amarela no Brasil: recomendações para a vigilância, prevenção e controle. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 20, n. 1, p. 101–106, 2011.
- RUSSELL, P. K., *et al.* A Plaque Reduction Test for *Dengue Virus* Neutralizing Antibodies. **The journal of immunology**, v. 99, n. 2, p. 285–290, 1967.
- RUSSELL, P. K.; Nisalak, A. *Dengue Virus* Identification by the Plaque Reduction Neutralization Test. **The journal of immunology**, v. 99, n. 2, p. 291–296, 1967.
- RUST, R. S. Human Arboviral Encephalitis. **Seminars in pediatric neurology**, v. 19, n. 3, p. 130–151, 2012.
- SAAD, L. D.; BARATA, R. B. Yellow fever outbreaks in São Paulo State, Brazil, 2000-2010. **Epidemiologia e serviços de saúde: revista do Sistema Unico de Saude do Brasil**, v. 25, n. 3, p. 531–540, 2016.
- SARAIVA, M.; O'GARRA, A. The regulation of IL-10 production by immune

cells. **Nature reviews. Immunology**, v. 10, n. 3, p. 170–181, 2010.

SCHAEFFER, E., *et al.* Dermal CD14⁺ Dendritic Cell and Macrophage Infection by Dengue Virus Is Stimulated by Interleukin-4. **The journal of investigative dermatology**, v. 135, n. 7, p. 1743–1751, 2015.

SCHNEIDER, H., *et al.* Chemotaxis of T-cells after infection of human choroid plexus papilloma cells with *Echovirus 30* in an *in vitro* model of the blood–cerebrospinal fluid barrier. **Virus research**, v. 170, n. 1–2, p. 66–74, 2012.

SCOTTO, G., *et al.* Impact of interleukin-27 on replication of hepatitis C virus. **International Journal of Interferon, Cytokine and Mediator Research**, v. 3, p. 79–89, 2011.

SHAMOUN, L., *et al.* Association of gene and protein expression and genetic polymorphism of CC chemokine ligand 4 in colorectal cancer. **World journal of gastroenterology: WJG**, v. 27, n. 30, p. 5076–5087, 2021.

SHEARER, F. M., *et al.* Existing and potential infection risk zones of yellow fever worldwide: a modelling analysis. **The Lancet. Global health**, v. 6, n. 3, p. e270–e278, 2018.

SHEN, Y., *et al.* Localization of the human GM-CSF receptor β chain gene (CSF2RB) to chromosome 22q12.2→q13.1. **Cytogenetic and genome research**, v. 61, n. 3, p. 175–177, 1992.

SHERIDAN, M. A., *et al.* African and Asian strains of Zika virus differ in their ability to infect and lyse primitive human placental trophoblast. **PLoS one**, v. 13, n. 7, p. e0200086, 2018.

SHRESTHA, B., *et al.* Gamma Interferon Plays a Crucial Early Antiviral Role in Protection against West Nile Virus Infection. **Journal of virology**, v. 80, n. 11, p. 5338–5348, 2006.

SILVA, M. L., *et al.* Characterization of main cytokine sources from the innate and adaptive immune responses following primary 17DD yellow fever vaccination in adults. **Vaccine**, v. 29, n. 3, p. 583–592, 2011.

SILVA, N. I. O., *et al.* Recent sylvatic *yellow fever virus* transmission in Brazil: the news from an old disease. **Virology journal**, v. 17, n. 1, p. 9, 2020.

SIMMONDS, P., *et al.* ICTV Virus Taxonomy Profile: *Flaviviridae*. **The Journal of general virology**, v. 98, n. 1, p. 2–3, 2017.

SIVORI, S., *et al.* CpG and double-stranded RNA trigger human NK cells by Toll-like receptors: induction of cytokine release and cytotoxicity against tumors and dendritic cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 101, n. 27, p. 10116–10121, 2004.

SLATTERY, M. L., *et al.* Dysregulated genes and miRNAs in the apoptosis pathway in colorectal cancer patients. **Apoptosis: an international journal on programmed cell death**, v. 23, n. 3–4, p. 237–250, 2018.

SREEKANTH, G. P., *et al.* Role of mitogen-activated protein kinase signaling in the pathogenesis of dengue virus infection. **Cellular signalling**, v. 48, p. 64–68, 2018.

STOCK, N. K., *et al.* Biological and Phylogenetic Characteristics of *Yellow Fever*

- Virus* Lineages from West Africa. **Journal of virology**, v. 87, n. 5, p. 2895–2907, 2013.
- STROKES, A., *et al.* The Transmission of Yellow Fever to *Macacus Rhesus*. **Journal of the American Medical Association**, v. 90, n. 4, p. 253, 1928.
- TEIXEIRA, L., *et al.* The Bacterial Symbiont *Wolbachia* Induces Resistance to RNA Viral Infections in *Drosophila melanogaster*. **PLoS biology**, v. 6, n. 12, p. e2, 2008.
- TER MEULEN, J., *et al.* Activation of the cytokine network and unfavorable outcome in patients with yellow fever. **The journal of infectious diseases**, v. 190, n. 10, p. 1821–1827, 2004.
- THOMAS, S. J., *et al.* Dengue Plaque Reduction Neutralization Test (PRNT) in Primary and Secondary *Dengue Virus* Infections: How Alterations in Assay Conditions Impact Performance. **The American journal of tropical medicine and hygiene**, v. 81, n. 5, p. 825–833, 2009.
- THUENER, J. Hepatitis A and B Infections. **Primary care**, v. 44, n. 4, p. 621–629, 2017.
- UTARINI, A., *et al.* Efficacy of Wolbachia-Infected Mosquito Deployments for the Control of Dengue. **The New England journal of medicine**, v. 384, n. 23, p. 2177–2186, 2021.
- VACCHELLI, E., *et al.* The ambiguous role of FPR1 in immunity and inflammation. **Oncoimmunology**, v. 9, n. 1, p. 1760061, 2020.
- VALERO, N., *et al.* Increased serum ferritin and interleukin-18 levels in children with dengue. **Brazilian journal of microbiology**, v. 50, n. 3, p. 649–656, 2019.
- VAN AALDEREN, M. C., *et al.* Blood and beyond: Properties of circulating and tissue-resident human virus-specific $\alpha\beta$ CD8⁺ T cells. **European journal of immunology**, v. 44, n. 4, p. 934–944, 2014.
- VIDYA, M. K., *et al.* Toll-like receptors: Significance, ligands, signaling pathways, and functions in mammals. **International reviews of immunology**, v. 37, n. 1, p. 20–36, 2018.
- VIVANCO-CID, H., *et al.* Dynamics of interleukin-21 production during the clinical course of primary and secondary dengue virus infections. **Immunology letters**, v. 161, n. 1, p. 89–95, 2014.
- VON LINDERN, J. J., *et al.* Genome analysis and phylogenetic relationships between east, central and west African isolates of *Yellow fever virus*. **Journal of general virology**, v. 87, n. Pt 4, p. 895–907, 2006.
- VOYTAS, D. Agarose Gel Electrophoresis. **Current Protocols in Molecular Biology**, v. Chapter 2, p. Unit2.5S, 2001.
- WAGGONER, J. J., *et al.* *Yellow Fever Virus*: Diagnostics for a Persistent Arboviral Threat. **Journal of clinical microbiology**, v. 56, n. 10, p. JCM.00827-18, 2018.
- WANG, P., *et al.* IL-22 signaling contributes to West Nile encephalitis pathogenesis. **PLoS one**, v. 7, n. 8, p. e44153, 2012.
- WANG, Y., *et al.* MicroRNA-34c targets TGF β -induced factor homeobox 2, represses cell proliferation and induces apoptosis in hepatitis B virus-related hepatocellular carcinoma. **Oncology letters**, v. 10, n. 5, p. 3095–3102, 2015.

WATSON, A.; KLIMSTRA, W. T Cell-Mediated Immunity towards Yellow Fever Virus and Useful Animal Models. **Viruses**, v. 9, n. 4, p. 77, 2017.

WATTS, J. C.; CHANDLER, F. W. The Surgical Pathologist's Role in the Diagnosis of Infectious Diseases. **Journal of histotechnology**, v. 18, n. 3, p. 191–193, 1995.

WERREN, J. H., *et al.* Distribution of *Wolbachia* among Neotropical Arthropods. **Proceedings. Biological sciences**, v. 262, n. 1364, p. 197–204, 1995.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis C. 2021a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-c>. Acesso em 19 ago 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis D. 2021b. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-d>. Acesso em 19 ago 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Hepatitis E. 2021c. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/hepatitis-e>. Acesso em 19 ago 2021.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Immunization, Vaccines and Biologicals. Yellow Fever. 2018. Disponível em: https://www.who.int/immunization/diseases/yellow_fever/en/. Acesso em 28 mar 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow Fever - Brazil. 2019b. Disponível em: <https://www.who.int/emergencies/disease-outbreak-news/item/11-february-2019-yellow-fever-brazil-en>. Acesso em 30 mar 2020.

WHO - WORLD HEALTH ORGANIZATION. Yellow Fever. 2019a. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/yellow-fever>. Acesso em 28 mar 2020.

WONG, S. H., *et al.* Virus-Like Particle Systems for Vaccine Development Against Viruses in the *Flaviviridae* Family. **Vaccines**, v. 7, n. 4, p. 123, 2019.

WRIGHT, P. A.; WYNFORD-THOMAS, D. The polymerase chain reaction: Miracle or mirage? A critical review of its uses and limitations in diagnosis and research. **The Journal of pathology**, v. 162, n. 2, p. 99–117, 1990.

XU, R., *et al.* Low expression of CXCR1/2 on neutrophils predicts poor survival in patients with hepatitis B virus-related acute-on-chronic liver failure. **Scientific reports**, v. 6, n. 1, 2016.

XU, X., *et al.* Low responsiveness to a hepatitis B virus vaccine in a Chinese population lacks association with ITGAL, CD58, TNFSF15, CCL15, TGFB3, and BCL6 gene variants. **Infection, genetics and evolution: journal of molecular epidemiology and evolutionary genetics in infectious diseases**, v. 64, p. 126–130, 2018.

YAN, Q., *et al.* Longitudinal Peripheral Blood Transcriptional Analysis Reveals Molecular Signatures of Disease Progression in COVID-19 Patients. **The journal of immunology**, v. 206, n. 9, p. 2146–2159, 2021.

YANG, J. S., *et al.* Induction of inflammation by *West Nile virus* capsid through the

caspase-9 apoptotic pathway. **Emerging infectious diseases**, v. 8, n. 12, p. 1379–1384, 2002.

YEN, J. H.; BARR, A. R. The etiological agent of cytoplasmic incompatibility in *Culex pipiens*. **Journal of invertebrate pathology**, v. 22, n. 2, p. 242–250, 1973.

YOLKEN, R. H. Enzyme-Linked Immunosorbent Assay (ELISA): A Practical Tool for Rapid Diagnosis of Viruses and Other Infectious Agents. **The Yale journal of biology and medicine**, v. 53, n. 1, p. 85–92, 1980.

YUE, H., *et al.* Reference gene selection for normalization of PCR analysis in chicken embryo fibroblast infected with H5N1 AIV. **Virologica sinica**, v. 25, n. 6, p. 425–431, 2010.

ZAMBON, A., *et al.* Common Variants in the Promoter of the Hepatic Lipase Gene Are Associated With Lower Levels of Hepatic Lipase Activity, Buoyant LDL, and Higher HDL₂ Cholesterol. **Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology**, v. 18, n. 11, p. 1723–1729, 1998.

ZENEWICZ, L. A., *et al.* Interleukin-22 but not interleukin-17 provides protection to hepatocytes during acute liver inflammation. **Immunity**, v. 27, n. 4, p. 647–659, 2007.

ZEREMSKI, M., *et al.* Intrahepatic levels of CXCR3-associated chemokines correlate with liver inflammation and fibrosis in chronic hepatitis C. **Hepatology**, v. 48, n. 5, p. 1440–1450, 2008.

ZHANG, L., *et al.* A novel mosquitocidal *Bacillus thuringiensis* strain LLP29 isolated from the phylloplane of *Magnolia denudata*. **Microbiological research**, v. 165, n. 2, p. 133–141, 2010.

ZHANG, Q., *et al.* Activation of the Ras/Raf/MEK pathway facilitates hepatitis C virus replication via attenuation of the interferon-JAK-STAT pathway. **Journal of virology**, v. 86, n. 3, p. 1544–1554, 2012.

ZHANG, Z., *et al.* *Flaviviridae* Viruses and Oxidative Stress: Implications for Viral Pathogenesis. **Oxidative medicine and cellular longevity**, v. 2019, p. 1409582, 2019.

ZIMMERMAN, M. G., *et al.* West Nile Virus Infection Blocks Inflammatory Response and T Cell Costimulatory Capacity of Human Monocyte-Derived Dendritic Cells. **Journal of virology**, v. 93, n. 23, 2019.