



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM IMUNOLOGIA BÁSICA E APLICADA**

**PERFIL DE PROTEÍNAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM MULHERES EXANTEMÁTICAS  
COM INFECÇÃO POR VÍRUS ZIKA ATENDIDAS EM UMA UNIDADE DE SAÚDE  
REFERÊNCIA EM DOENÇAS INFECCIOSAS EM MANAUS, AMAZONAS**

**SAINTCLAYTON DA SILVA SOARES**

**MANAUS**

**2023**

**SAINTCLAYTON DA SILVA SOARES**

**PERFIL DE PROTEÍNAS PRÓ-INFLAMATÓRIAS E CITOCINAS PRÓ-  
INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS EM MULHERES EXANTEMÁTICAS  
COM INFECÇÃO POR VÍRUS ZIKA ATENDIDAS EM UMA UNIDADE DE SAÚDE  
REFERÊNCIA EM DOENÇAS INFECCIOSAS EM MANAUS, AMAZONAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada da Universidade Federal do Amazonas, como requisito para obtenção do grau de *Mestre em Imunologia Básica e Aplicada*.

Orientador: Prof Dr Rajendranath Ramasawmy

Coorientadora: Profa Dra Camila Helena Aguiar Bôtto de Menezes

**MANAUS**

**2023**

## Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S676p	<p>Soares, Saintclayton da Silva</p> <p>Perfil de proteínas pró-inflamatórias e citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em mulheres exantemáticas com infecção por vírus Zika atendidas em uma unidade de saúde referência em doenças infecciosas em Manaus, Amazonas / Saintclayton da Silva Soares . 2023</p> <p>60 f.: il. color; 31 cm.</p>
	<p>Orientador: Rajendranath Ramasawmy Coorientadora: Camila Helena Aguiar Bôtto de Menezes Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada) - Universidade Federal do Amazonas.</p>
	<p>1. Zika. 2. Mulheres exantemáticas. 3. Biomarcadores inflamatórios positivos. 4. Biomarcadores inflamatórios negativos. 5. Citocinas. I. Ramasawmy, Rajendranath. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título</p>

## DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a minha mãe Eliete Soares e as minhas duas filhas Samilly Victória e Maria Luiza.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço à Deus pela oportunidade de voltar a estudar e a concluir o meu tão sonhado mestrado, o qual sonhei a quase 20 anos atrás, que por motivos pessoais só pude voltar a estudar nesse período.

Agradeço meu melhor exemplo de vida, minha mãe, Eliete Soares, que com tantas dificuldades criou três filhos praticamente sozinha. Deus te proteja, minha rainha.

Agradeço as minhas duas filhas, Samilly Victória e Maria Luiza, razões de minha vida.

Agradeço ao meu orientador Dr. Rajendranath Ramasawmy, que carinhosamente chamamos de Rajen. Obrigado pelo aceite do meu convite e pela compreensão.

Agradeço a Dra Camila Bôtto, quando pensei em desistir por várias vezes, ela sempre me ajudou no que pode.

Agradeço a paciência, a humildade e a compreensão da Prof (a) Dra Jerusa, que soube conduzir com maestria e habilidade o curso durante a pandemia.

Agradeço ao PPGIBA de modo geral, professores e funcionários da secretaria.

Agradeço aos meus amigos do grupo de 5 que batizamos, Josué Lacerda, Távila Amorin, Itaciara Azevedo e Gustavo Coelho.

Agradeço a enorme ajuda desse garoto de ouro Dr. José do Espírito Santo Júnior.

Agradeço ao Setor de Virologia da Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado pelo apoio da gerente Márcia Castilho, e ao senhor Elden da Diagnocel pela parceria e suporte.

## RESUMO

O vírus Zika é um flavivírus identificado pela primeira vez em Uganda em 1947. O principal vetor é o mosquito *Aedes aegypti*. A doença pode apresentar um quadro exantemático que estão associados as manifestações leves como febre e artralgia e formas mais complicadas como a síndrome de Guillain-Barré na população adulta e a síndrome congênita em crianças expostas ao vírus no período intrauterino. O estudo é do tipo descritivo tipo série de casos e objetiva descrever o perfil de proteínas pró-inflamatórias e de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em mulheres em idade fértil com doença exantemática positiva e negativa para o vírus Zika. Destas proteínas inflamatórias analisamos os biomarcadores inflamatório positivos como  $\alpha$ 1-glicroteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, proteínas do complemento C3 e C4, e ferritina, e biomarcadores inflamatório negativos como albumina e transferrina. Também avaliamos a função hepática e função renal dessas pacientes. Todos as dosagens foram realizadas em analisador bioquímico Architect exceto a ferritina que foi dosada em analisador imunológico. Analisamos o perfil de 26 citocinas e quimiocinas dessas pacientes através da técnica do luminex. Em nossos resultados encontramos nos controles positivos, pacientes Zika exantemáticas, o aumento apenas do biomarcador inflamatório positivo proteína C reativo e nos exames adicionais, o  $\gamma$ -GT, e que nos controles negativos, pacientes exantemáticas Zika negativo, ocorreu o mesmo, mas com aumento de  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e nos exames de função hepática, marcadores levemente aumentados. No perfil de 26 citocinas, encontramos em ambos controles, a presença de citocinas que indicaram a resposta de células Th1, Th2 e Th9. A conclusão de nossos estudos observamos o vírus circulante em Manaus, o aumento apenas de um biomarcador inflamatório positivo, a proteína C reativa, e o aumento de  $\gamma$ -GT nos testes adicionais. E nenhum biomarcador negativo apresentou um aumento significativo. No perfil das 26 citocinas analisadas, houve o aumento da CXCL-10 (IP-10) e da IL-5 nas exantemáticas com Zika chamou a atenção. A presença de IL-12p40 e IL-15 podendo estar relacionada a infecção viral e a presença da IL-9 com papel modulador.

Palavras-chaves: Zika, mulheres exantemáticas, biomarcadores inflamatório positivo, biomarcadores inflamatórios negativos e citocinas

## ABSTRAT

The Zika virus is a flavivirus first identified in Uganda in 1947. The main vector is the *Aedes aegypti* mosquito. The disease can present an exanthematous condition that is associated with mild manifestations such as fever and arthralgia and more complicated forms such as Guillain-Barré syndrome in the adult population and congenital syndrome in children exposed to the virus intrauterinely. The study is a descriptive case series and aims to describe the profile of pro-inflammatory proteins and pro-inflammatory and anti-inflammatory cytokines in women of childbearing age with positive and negative exanthematous disease for the Zika virus. Of these inflammatory proteins, we analyzed positive inflammatory biomarkers such as  $\alpha$ 1-acid glucoprotein, ceruloplasmin, haptoglobin, complement proteins C3 and C4, and ferritin, and negative inflammatory biomarkers such as albumin and transferrin. We also evaluated the liver function and kidney function of these patients. All measurements were carried out on an Architect biochemical analyzer, except for ferritin, which was measured on an immunological analyzer. We analyzed the profile of 26 cytokines and chemokines in these patients using the luminex technique. In our results we found in the positive controls, exanthematic Zika patients, an increase only in the positive inflammatory biomarker C-reactive protein and in additional tests,  $\gamma$ -GT, and in the negative controls, negative Zika exanthematic patients, the same occurred, but with an increase of  $\alpha$ 1-acid glycoprotein and in liver function tests, markers were slightly increased. In the profile of 26 cytokines, we found in both controls the presence of cytokines that indicated the response of Th1, Th2 and Th9 cells. At the conclusion of our studies, we observed the virus circulating in Manaus, an increase in only one positive inflammatory biomarker, C-reactive protein, and an increase in  $\gamma$ -GT in additional tests. And no negative biomarkers showed a significant increase. In the profile of the 26 cytokines analyzed, an increase in CXCL-10 (IP-10) and IL-5 in Zika rashes attracted attention. The presence of IL-12p40 and IL-15 may be related to viral infection and the presence of IL-9 with a modulatory role.

**Keywords:** Zika, rash women, positive inflammatory biomarkers, negative inflammatory biomarkers and cytokines

## LISTA DE TABELAS

Tabela 01	Dados estatísticos de Zika de 2020 a 2022	20
Tabela 02	Dados estatísticos da região Norte	21
Tabela 03	Dosagens de proteínas e funções hepática e renal	34
Tabela 04	Dosagens de citocinas e quimiocinas	53



## LISTA DE QUADROS

Quadro 01	Proteínas estruturais e não estruturais	17
Quadro 02	Tipos de biomarcadores inflamatórios positivos e negativos	22
Quadro 03	Valores de referência	54

## LISTA DE FIGURAS

Figura 01	Mapa mundial mostrando surto de Zika	14
Figura 02	Ciclo de transmissão do Zika vírus na África	16
Figura 03 A	Estrutura do vírion do vírus Zika	17
Figura 03 B	Organização do genoma do vírus Zika	17
Figura 04 A,B,C	Erupção cutânea na febre Zika	18
Figura 04 D	Conjuntivite em pacientes com Zika	18
Figura 05	Infecção e patogênese	19
Figura 06	Amostra no <i>sumple cup</i>	31
Figura 07	Gráfico de Levey-jennings	31
Figura 08	Fluxograma do estudo	33
Figura 09 A	Comparações de citocinas em Zika positivo e negativo	35
Figura 09 B	Gráfico de Jitter-plot – com 26 citocinas	55
Figura 10	Gráfico de Spearman Zika Negativo	36
Figura 11	Gráfico de Spearman Zika Positivo	37
Figura 12	Gráfico de correlação de rede Zika positivo	38
Figura 13	Gráfico de correlação de rede Zika Negativo	38

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

C3	Complemento C3
C4	Complemento C4
sPLA2-II	fosfolipase A2 secretória grupo II
PCR	Proteína -C reativa
SE	Semana Epidemiológica
NS	Partícula não-estrutural
PrM	Proteína pré-membrana
ZF	Febre Zika Aguda
IL	Interleucina
MIP	Proteína Inflamatória do macrófago
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
IFN	Interferon
TNF	Fator de necrose tumoral
DENV	Vírus da dengue
CHKV	Vírus Chikungunya
DC	Células Dendríticas
TLR	Receptores Toll-Like

## SUMÁRIO

1.	<b>INTRODUÇÃO</b>	12
2.	<b>REVISÃO DE LITERATURA</b>	14
2.1	Histórico da doença	14
2.1.1	Arbovírus Zika	14
2.2	Agentes etiológicos e ciclo biológico	15
2.3	Característica do Arbovírus Zika	16
2.3.1	Estrutura e organização das proteínas do vírus Zika	16
2.3.2	Sintomatologia	17
2.3.3	Resposta Imunológica	18
2.4	<b>EPIDEMIOLOGIA</b>	20
3	Proteínas de fase aguda - biomarcadores inflamatórios	21
3.1	$\alpha$ 1- glicoproteína ácida	23
3.2	Proteína C reativa	23
3.3	Haptoglobina	23
3.4	Ceruloplasmina	24
3.5	Albumina	24
3.6	Proteínas do completo C3 e C4	24
3.7	Ferritina	24
3.8	Transferrina	25
4.	<b>JUSTIFICATIVA</b>	26
5.	<b>OBJETIVOS</b>	27
5.1	Objetivo geral	27
5.2	Objetivos específicos	27
6.	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b>	28

6.1	Tipo de estudo	28
6.2	Área do estudo	28
6.3	Aspectos Éticos	28
6.4	População do Estudo	28
6.5	Critério de Elegibilidade	28
6.6	Seleção dos participantes do estudo	28
6.7	Identificação de infecções que cursam com exantema agudo	29
6.8	Avaliação dos níveis de proteínas pró e anti-inflamatória, função hepática e função renal	30
6.9	Avaliação dos níveis de citocinas pró e anti-inflamatória	32
6.10	Análises estatísticas	32
<b>7.</b>	<b>RESULTADOS</b>	<b>33</b>
7.1	População de estudo	33
7.2	Dosagem de proteínas inflamatórias	33
7.3	Comparação de citocinas entre pacientes Zika positivo e Zika negativo	35
7.4	Correlação de Spearman entre grupos Zika positivo e Zika negativo	35
7.5	Análise de rede de citocinas	38
<b>8.</b>	<b>DISCUSSÃO</b>	<b>40</b>
<b>9.</b>	<b>CONCLUSÃO</b>	<b>44</b>
<b>10.</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>45</b>
<b>11.</b>	<b>APÊNDICES</b>	<b>53</b>
<b>12.</b>	<b>ANEXO</b>	<b>56</b>

## 1. INTRODUÇÃO

O Vírus Zika é vírus proveniente da África que tem cepas tanto africanas como asiáticas causadoras da doença Zika transmitido por mosquito principalmente o *Aedes aegypti* que acomete tanto macacos como humanos em seu ciclo evolutivo, que apresenta em seu quadro clínico as formas assintomáticas e sintomáticas, que podem variar de um quadro leve como febre baixa até a evolução para forma mais grave e levar a óbito.

A doença pode apresentar um quadro exantemático que é definida como qualquer erupção cutânea (*rash*) que pode estar associada a lesões da mucosa membranas (enantema), febre ou sintomas sistêmicos (DRAGO et al. 2017).

As duas principais preocupações de saúde pública relacionadas à infecção pelo ZIKV são sua associação com manifestações neurológicas, principalmente síndrome de Guillain-Barré, meningite e meningoencefalite na população adulta e a transmissão vertical durante a gravidez que está ligada ao desenvolvimento de anormalidades cerebrais no feto e outras anomalias relacionadas à síndrome congênita do Zika. Os fatores de risco associados à infecção pelo ZIKV na gravidez e à síndrome congênita do Zika permanecem obscuros e variam muito de país para país; no entanto, sua incidência foi relatada como particularmente alta no Brasil (CAMACHO-ZAVALA et al. 2021).

Na Amazônia, outras doenças podem ser causadoras de sintomas como febre, com temperatura variável, e ainda apresentar exantemas confundindo com sintomas de Zika. Essas doenças tem como causas arboviroses (dengue, e em menor número Chikungunya, Oropoche e Mayaro) mas também por outras doenças que causam um confuso diagnóstico clínico. Essas doenças podem ser as ISTs como HIV (Vírus da imunodeficiência Humana) e sífilis, e ainda sarampo, Epstein Barr, Parvovírus B-19, rubéola e citomegalovírus. Todas essas doenças têm como uma de suas características a presença de manchas avermelhadas na pele de pacientes com diagnóstico para cada doença.

O que pode auxiliar no diagnóstico e o acompanhamento do tratamento em pacientes acometidos por essas doenças supracitadas são as dosagens de proteínas de fase aguda ou proteínas reagentes.

Uma proteína de fase aguda foi definida como aquela cuja concentração plasmática aumenta (proteínas de fase aguda positivas) ou diminui (proteínas de fase

aguda negativas) em pelo menos 25% durante distúrbios inflamatórios (GABAY et al. 1999).

As proteínas de fase aguda são divididas em biomarcadores inflamatórios positivos e estão classificadas como proteína do sistema de coagulação como o fibrinogênio, proteínas do sistema complemento como C3 e C4, proteínas de transporte como ceruloplasmina e haptoglobina, participantes da resposta inflamatória como fosfolipase A2 secretória (sPLA2-IIA), Anti-protetoras como alfa1-Antiquimiotripcina, e aquelas que não se enquadram em nenhuma dessas classificações como proteína C reativa (PCR) e ferritina. Também há biomarcadores inflamatórios negativos como albumina, transferrina e alfa-fetoproteína (ROSA NETO; CARVALHO 2009).

## 2. REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Histórico da Doença

#### 2.1.1 Arbovírus Zika

O vírus Zika (ZIKV), é um vírus de RNA de cadeia positiva envelopado pertencente à família *Flaviviridae*. Semelhante à maioria dos flavivírus, o ZIKV é predominantemente transmitido pelo *Aedes spp.* mosquitos. No entanto, a transmissão sexual e a transmissão de mãe para filho também foram relatadas (SUN et al. 2020).

O vírus foi identificado pela primeira vez nas regiões africanas em Kampala, Uganda, na floresta Zika em 1947 em um macaco rhesus, cinco anos depois, o vírus foi encontrado se espalhando descontroladamente em toda a África. O vírus então migrou para a Ásia na década de 1980 como uma cepa diferente da cepa africana. Além disso, a cepa asiática causou surtos isolados fora da Ásia, resultando em surtos maiores na Polinésia Francesa durante 2007, 2013 e 2014. O maior surto de ZIKV da história ocorreu em maio de 2015 no Nordeste do Brasil e atingiu proporções pandêmicas (PIELNAA et al. 2020) (Figura 1).

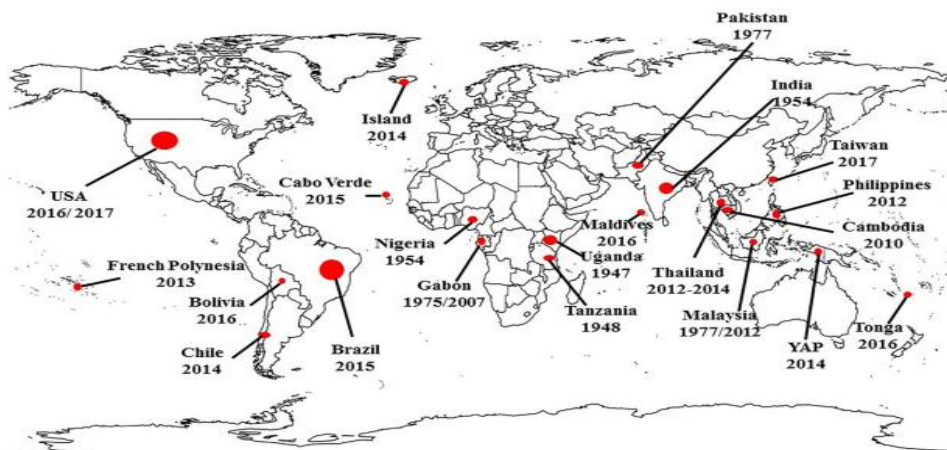


Figura 1: Mapa mundial mostrando os surtos mais comuns de ZIKA.

O vírus ZIKA foi observado em partes da África e do Sudeste Asiático, mas desde 2007 em diante, ocorreram vários surtos fora dessas regiões e se espalharam para vários outros países em anos diferentes (JAVED et al. 2017).

O surto de ZIKA em 2013, foi relatado na ilha do pacífico da Polinésia Francesa, causou infecção grave, acompanhada de epidemia de dengue. Esse surto de ZIKV atingiu aproximadamente 29.000 pessoas, nas quais 72 casos mostraram sintomas graves. Depois disso, as epidemias se espalharam para algumas outras ilhas, como por exemplo, Nova Caledônia, Vanuatu, Ilhas Cook e Ilhas Salomão. No início de



2014, o primeiro surto autóctone com cinquenta e um casos foi relatado na Ilha de Páscoa (TOGNARELLI et al. 2015).

A doença mais devastadora da infecção pelo ZIKV é a síndrome congênita do Zika, incluindo microcefalia, malformações congênitas e morte de fetos de mulheres grávidas infectadas. Em adultos, a infecção pelo ZIKV está associada à síndrome de Guillain-Barré (SGB), uma doença autoimune que pode levar à paralisia. Um em cada sete bebês nascidos de mães com infecção por ZIKV confirmada em laboratório durante a gravidez apresenta defeitos congênitos, provavelmente devido à transmissão *in útero*. Seu potencial teratogênico e epidemias explosivas levaram a Organização Mundial da Saúde (OMS), a declarar o ZIKV como uma Emergência de Saúde Pública de Interesse Internacional em fevereiro de 2016 (SHAN, 2019).

O primeiro caso confirmado de infecção pelo ZIKV nas Américas foi relatado no Nordeste do Brasil em maio de 2015, embora estudos filogenéticos indiquem a introdução do vírus muito antes (2013 a 2014) (GIOVANETTI et al. 2022). Em julho de 2015, funcionários do Ministério da Saúde do Brasil relataram uma associação entre a infecção pelo vírus Zika e a síndrome de Guillain-Barré em adultos. Em outubro de 2015, a OMS recebeu notificações do Brasil de microcefalia em bebês cujas mães foram expostas ao Zika durante a gravidez. No momento, não havia prova de uma ligação causal entre a infecção pelo Zika e essas complicações neurológicas (KINDHAUSAER et al. 2016).

## **2.2 Agentes etiológico e ciclo biológico**

Estudos filogenéticos do genoma viral indicam que o ZIKV provavelmente surgiu na África por volta de 1920. Desde então, mantém seu ciclo natural na África principalmente entre macacos e espécies silvestres de mosquitos *Aedes* (*Ae. furcifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. pock* e *Ae. africanus*), com ocasionais infecções humanas (Figura 2).

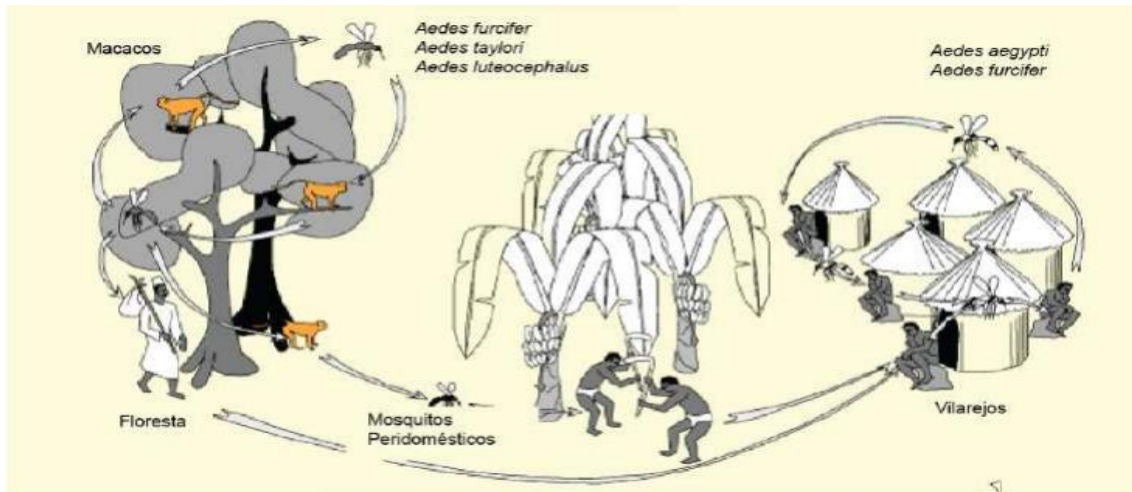


Figura 2 - Ciclo de transmissão do Zika vírus na África. O vírus mantém seu ciclo de transmissão silvestre nas florestas, ocorrendo principalmente entre macacos e mosquitos, com infecções humanas ocasionais. Fonte: FREIRE, 2014.

## 2.3 Características do arbovírus Zika.

### 2.3.1 Estrutura e organização proteica do vírus Zika

É um vírus de forma esférica, envelopado em sentido positivo, RNA do tipo fita simples (ssRNA) (JAVED et al. 2017). O RNA é traduzido em uma única poliproteína que codifica 3 proteínas estruturais – capsídeo (C); membrana (M), que é gerada a partir de sua pré-membrana precursora (prM); e envelope (E) (Figura 3A) - bem como 7 proteínas não estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Quadro 1; Figura 3B). As proteínas estruturais, como o nome sugere, formam a partícula do vírus. As proteínas não estruturais auxiliam na replicação e empacotamento do genoma, bem como na subversão das vias do hospedeiro em favor do vírus. A geração das 10 proteínas individuais da poliproteína é regulada por proteases virais e do hospedeiro, e a eficiência de uma das proteases do hospedeiro (furina) na clivagem dos alvos virais (prM) é variável e pode desempenhar um papel na patogênese. (SIROHI; KUHN, 2017).

Quadro 1. Proteínas estruturais e não estruturais do vírus ZIKA (KUHN et al. 2002).

Nome das proteínas	Simbolo	Tamanho (aa)	Localização na célula	Função na célula
<b>Estrutural</b>				
Capsídeo	C	122	Citoplasma	Formação do nucleocapsídeo viral
Pré-membrana	prM	178	Citoplasma	Formação do capsídeo viral, fusão da célula do hospedeiro
Envelope	E	800	Citoplasma	Entrada do receptor do hospedeiro
<b>Não estrutural</b>				
Proteína NS1	NS1	384	Citoplasma	Emissão, virulência e replicação
Proteína NS2	NS2A	226	Citoplasma	Transcrição vira e montagem
Proteína NS2	NS2B	130	Citoplasma	Co-fator NS3 para função de serena protease
Proteína NS3	NS3	617	Citoplasma	Desenrolamento da região modelo de proteína estrutural e processamento de vírus
Proteína NS4	NS4A	127	Citoplasma	Replicação viral
Proteína NS4	NS4B	252	Citoplasma	Complexo de replicação viral
Proteína NS5	NS5	902	Citoplasma	Replicação de RNA via RNA polimerase

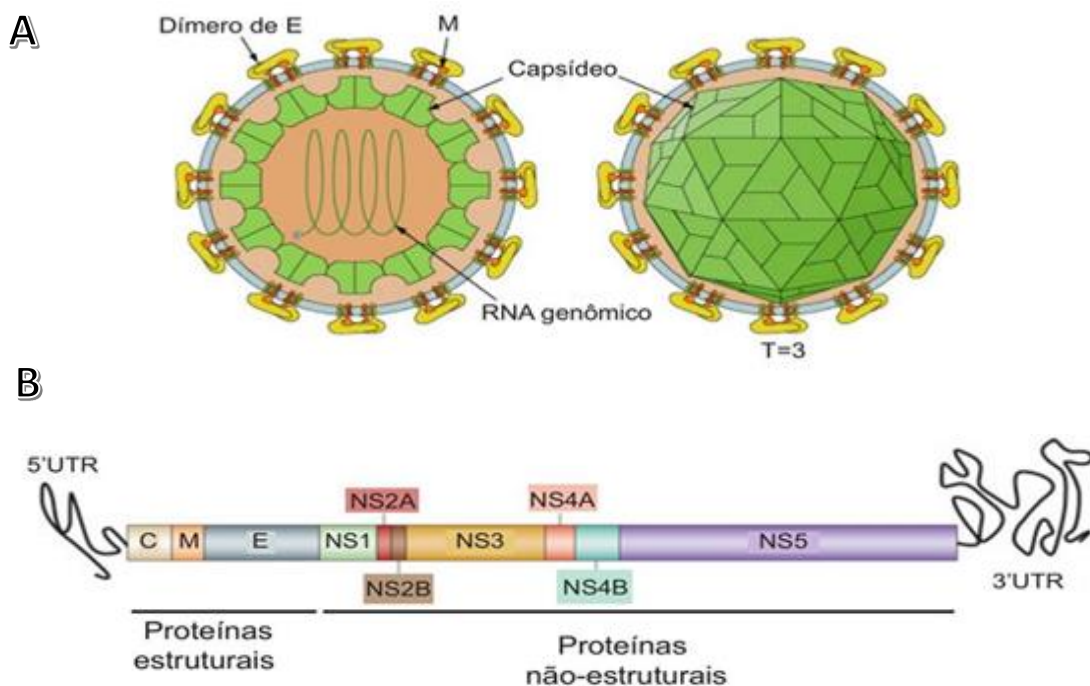
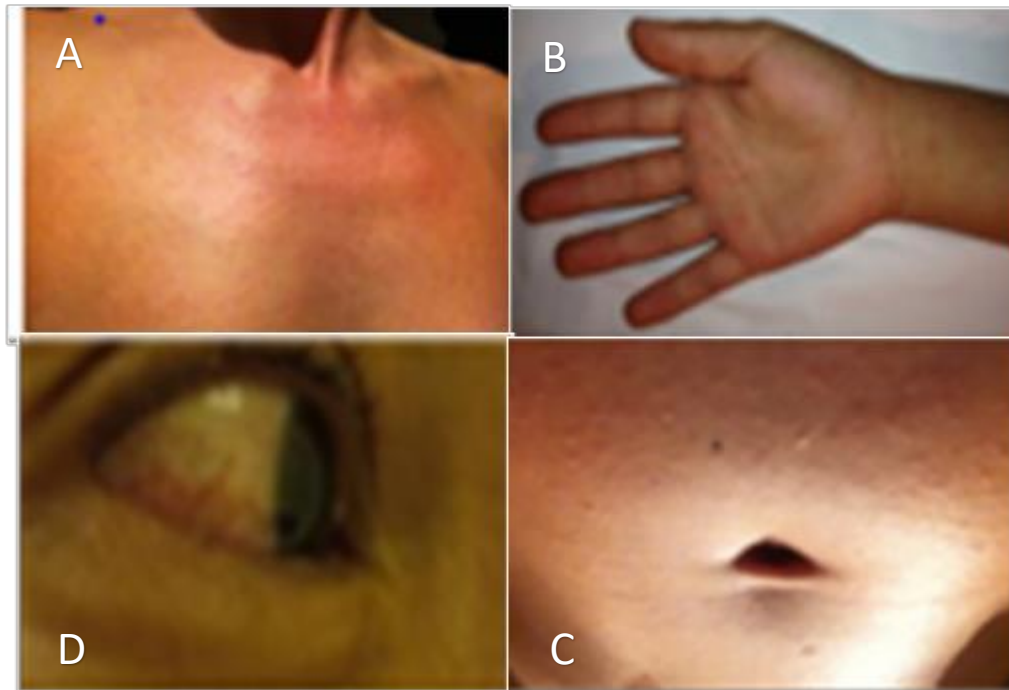


Figura: 3 Estrutura do vírion (A) e Organização do genoma do vírus Zika (B) (SILVA, 2017).

### 2.3.2 Sintomatologia

Nas arboviroses, o tipo de exantema pode variar de acordo com o vírus causador da doença, podendo aparecer entre o primeiro e o décimo segundo dia após o aparecimento dos primeiros sintomas. Nas infecções por Zika, o exantema pode ocorrer entre 90% a 100% dos casos, respectivamente. As implicações das erupções cutâneas no prognóstico e no curso clínico dos arbovírus ainda não estão claras

(MACIEL et al. 2022). Além do aparecimento do exantema, (Figura 4 A, B e C) a doença apresenta um quadro febril baixo, cefaleia, dor retro-orbitária (Figura 4 D), artralgia, conjuntivite e edema de extremidades (HAMEL et al. 2015).



Figuras: 4 – A, B e C erupção cutânea; D – Conjuntivite na febre Zika (MUSSO; GUBLER 2016)

Os sintomas clínicos e os achados laboratoriais mais simples, trombocitopenia e leucopenia no hemograma ou alterações nas transaminases hepáticas (aspartato aminotransferase -AST ou transaminase glutâmico oxalacética- TGO; alanina aminotransferase- ALT ou transaminase glutâmica pirúvica- TGP), são típicos de várias outras doenças causadas por arbovírus, principalmente dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV). Atualmente, nove doenças com essas características são circulantes no Brasil: Dengue, Chikungunya, Febre Amarela, Vírus da Encefalite Saint Louis, Mayaro, Oropouche, Vírus *West Nilo*, sendo essa última raríssima com apenas um caso relatado no país (MUSSO; GUBLER, 2016).

### 2.3.3 Resposta Imunológica

O ZIKV é transmitido pela picada de um mosquito *Aedes* infectado (Figura 5). Tanto os fibroblastos dérmicos quanto os queratinócitos epidérmicos são alvos da infecção pelo ZIKV, potencialmente transmitindo a infecção às células dendríticas dérmicas (células de Langerhans), facilitando assim a disseminação do ZIKV (OLAGNIER et al. 2016).

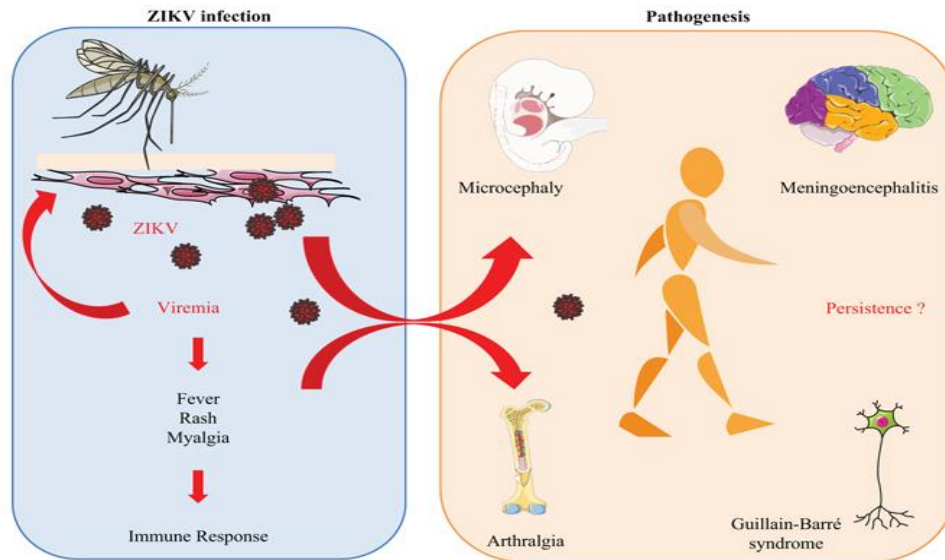


Figura 5: Infecção pelo Vírus - da introdução através da pica do mosquito até o aparecimento dos sintomas (MAUCOURANT et al. 2019).

Os receptores de imunidade inata (receptores Toll-like/TLRs e RIG-like receptores/RLRs) são importantes para o reconhecimento inicial do vírus Zika (ZIKV), modulação da resposta imune protetora e produção de IFN- $\alpha$  e IFN- $\beta$ . (SILVA et al. 2019). Semelhante a outros patógenos virais, o ZIKV parece ter desenvolvido uma preferência afinada por células-alvo específicas que oferecem microambientes imunológicos mais propícios às etapas de replicação viral. As células-alvo preferidas para ZIKV incluem células placentárias, células neuroprogenitoras e células mielóides circulantes, todos expressando altos níveis do receptor de entrada do ZIKV, AXL. A escolha de células dendríticas (DCs) e monócitos como células-alvo preferenciais para ZIKV parece paradoxal, pois essas células abrigam uma rede complexa de sensores imunológicos inatos que podem reconhecer ácidos nucleicos virais e ativar potentes células dependentes de interferon tipo I (IFN-I). Por exemplo, em algumas células-alvo virais, o ZIKV pode inibir a fosforilação e promover a degradação proteossômica do STAT2 humano, um regulador chave a jusante das respostas do IFN-I (SUN et al. 2020).

A atividade das células NK é moldada pela integração de sinais que surgem da ligação de uma vasta gama de receptores presentes na superfície dessas células. Eles incluem não apenas receptores inibitórios, como KIR-L e NKG2A, mas também receptores ativadores, como os receptores naturais de citotoxicidade (NKp30, NKp44 e NKp46), NKG2D e NKG2C. Embora os ligantes para receptores inibitórios sejam principalmente moléculas MHC classe I, aqueles para receptores ativadores, exemplificados pela cadeia relacionada MHC classe I - MIC-A, MIC-B e ULBP-1 a -6 para o receptor NKG2D, são diversos e sua expressão é regulada positivamente sob

condições de estresse celular, em particular durante a infecção viral, permitindo assim que as células NK eliminem especificamente as células hospedeiras infectadas nocivas. Quando os sinais de ativação predominam, as células NK produzem uma série de citocinas pró-inflamatórias, principalmente IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , em paralelo com o início de suas funções citotóxicas (MAUCOURANT et al. 2021).

Na fase aguda de ZF (febre Zika aguda), elevações significativas de concentração de interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13, IL-17, também quanto à proteína 10 induzida por interferon- $\gamma$  (IP-10), proteína inflamatória macrófaga 1-alfa (MIP-1 $\alpha$ ) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF). Na fase de recuperação, aumentos significativos demonstrados nos níveis de IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, IL-13, como bem como de IP-10, RANTES, MIP-1 $\alpha$ , MIP-1  $\beta$  e VEGF, fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator estimulador de colônia de granulócitos-macrófagos (GM-CSF). Quanto aos níveis de interferon- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) há uma tendência de aumento na fase aguda e de recuperação (não significativo), enquanto as concentrações de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ) mostram apenas um aumento médio durante a fase aguda (também não significativo) (TAPPE et al. 2015).

## 2.4 EPIDEMIOLOGIA

Segundo dados divulgados pelo site do Ministério da Saúde, somente de janeiro a fevereiro de 2023, já foram notificados 1.194 casos prováveis da doença, um aumento de 35,2% quando comparado ao mesmo período de 2022, quando 883 casos prováveis foram registrados. A região Norte do país apresenta, em 2023, a maior incidência da doença, com 2,8 casos por 100 mil habitantes, seguida das regiões Nordeste, com 1,0 caso por 100 mil habitantes e Sul, com 0,5 caso por 100 mil habitantes.

**Tabela 1 Doenças/ Agravos - Casos confirmados e Óbitos. Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado - FMT-HVD.**

Doenças / Agravos	2020		2021		2022	
	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos	Casos	Óbitos
<b>ZIKV</b>	27	0	13	0	06	0

Dados de Janeiro a dezembro. Fonte: SINAN NET

Com relação aos dados de Zika, ocorreram 9.260 casos prováveis até a SE (Semana Epidemiológica) 44 de 2022, correspondendo a uma taxa de incidência de 4,3 casos por 100 mil habitantes no País. Em relação a 2019, os dados representam um aumento de 5,0% no número de casos do País. Quando comparado com o ano de 2021, observa-se um aumento de 46,1% no número de casos (MS, 2022).

**Tabela 2: Casos na região norte - 2002**

Região / UF	Casos	Incidência (casos/100 mil hab)
Norte	628	3,3
Rondônia	41	2,3
Acre	12	1,3
Amazonas	259	6,1
Roraima	07	1,1
Pará	101	1,2
Amapá	23	2,6
Tocantins	185	11,5

Fonte: Sinan On-line (banco de dados atualizados em 14/11/2022, referente à SE 48). Sinan Net (banco atualizado em 8/12/2022).

### 3 Proteínas de fase aguda – biomarcadores inflamatórios

Um biomarcador é uma molécula que pode ser medida em uma amostra biológica de forma objetiva, sistemática e precisa, cujos níveis indicam se um processo é normal ou patológico. Os biomarcadores podem ser usados para diagnosticar, na avaliação da gravidade da doença, para estratificar o risco, prever e orientar as decisões clínicas e orientar os tratamentos e a resposta a eles (HERNÁNDEZ; RUEDA, 2023).

A imunidade inata é a primeira linha de resistência contra patógenos microbianos e está envolvida na ativação de respostas imunes adaptativas, bem como no reparo tecidual. Esse tipo de imunidade é composto por um braço celular e um braço humoral. As respostas de fase aguda são induzidas em células do fígado ou outros tipos de células por citocinas inflamatórias primárias. A IL-6 é um potente indutor da produção de proteínas de fase aguda no fígado por meio da reprogramação e reorientação das funções metabólicas (por exemplo, diminuição da produção de albumina e aumento produção de proteínas de fase aguda). (MANTOVANI; GARLANDA, 2023). A interleucina-1 e a interleucina-6 são os principais reguladores da síntese proteica de fase aguda no fígado por meio da ativação de uma rede de fatores de transcrição (transdutor de sinal e ativador da transcrição 3 (STAT3), fator nuclear  $\kappa$ B e CCAAT/enhancer- proteínas de ligação) e metilação de CpG nos sítios de ligação desses fatores de transcrição. (EHLTING; WOLF; BODE, 2021).

A resposta de fase aguda caracteriza-se pela alteração na concentração sérica de certas proteínas após a injúria tecidual, algumas respondendo com elevação (biomarcadores positivos) e outras com diminuição (biomarcadores negativos) de

suas concentrações. Essas proteínas terão funções pró e anti-inflamatórias e podem estimular ou inibir a produção umas das outras (ROSA NETO; CARVALHO, 2009).

Quadro 2. Biomarcadores inflamatórios positivos e negativos.

<b>Biomarcadores inflamatórios positivos</b>	
<b>Sistema de coagulação/ Fibrinólise</b>	<b>Proteínas Transportadoras</b>
Fibrinogênio	Ceruloplasmina
Plasminogênio	Haptoglobina
Ativador de plasminogênio tecidual	<b>Antiproteases</b>
Uroquinase	$\alpha$ 1-Antiprotease
Proteína S	$\alpha$ 1-Antiquimiotripsina
Vitronectina	Inibidor da tripsina pancreática
Inibidor do ativador de plasminogênio tecidual 1	Inibidor da interalfatripsina
<b>Sistema complemento</b>	<b>Participante da Resposta Inflamatória</b>
C3; C4; C9	Fosfolipase A2 secretória (sPLA2-IIA)
Fator B	Proteína ligadora de lipopolissacarídeo (LPS)
Inibidor C1 (C1 INH)	Antagonista do receptor de interleucina-1 (IL-1RA)
Proteína Ligadora C4b	Fator estimulador de colônias – granulócitos (G-CSF)
Lectina ligadora de manose (MBL)	
<b>Outros</b>	
Proteína C reativa	
Proteína sérica amiloide A (SAA)	
$\alpha$ 1-glicoproteína ácida (AGP)	
Fibronectina	
Ferritina	
Angiotensinogênio	
<b>Biomarcadores inflamatórios negativos</b>	<b>Biomarcadores inflamatórios negativos</b>
Albumina	Alfafetoproteína (AFP)
Transferrina	Globulina ligadora de tiroxina
Transtirretina	Fator de crescimento insulina-símile-1 (IGF-1)
$\alpha$ 2-HS glicoproteína	Fator XII

Fonte: ROSA NETO; CARVALHO, 2009.

Em vista da variabilidade de biomarcadores inflamatórios classificados como positivos e negativos que fazem parte da imunidade inata, nossos estudos tiveram como base as análises das concentrações das seguintes proteínas inflamatórias como:  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida, haptoglobina, ceruloplasmina, transferrina, PCR (proteína C reativa), proteínas do complemento C3 e C4, ferritina e albumina. nas amostras de mulheres acometidas pelo vírus Zika que apresentaram em seu quadro clínico, o exantema.



**3.1  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (AGP)** - A  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida (orosomucóide, AGP) é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado e tecidos periféricos em resposta à reação sistêmica à inflamação (CECILLIANI, LECCI 2019). Ela tem atividade tanto pró como anti-inflamatória. Dentre suas funções estão a inibição da resposta quimiotática e da produção de superóxidos por neutrófilos, a inibição da agregação plaquetária e a indução da liberação de citocinas de monócitos (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-12, TNF- $\alpha$ , IL-1Ra e receptor de TNF- $\alpha$  solúvel) (ROSA NETO; CARVALHO 2009).

**3.2 Proteína C reativa**- É um biomarcador inflamatório sintetizada pelo fígado em resposta à secreção de várias citocinas inflamatórias, incluindo interleucina IL-1, IL-6 e fator de necrose tumoral (TNF). Essas citocinas pró-inflamatórias aumentam a concentração de PCR e suportam o processo inflamatório em andamento, enquanto uma diminuição em sua concentração geralmente anuncia o desaparecimento e o término da inflamação O principal papel da PCR na inflamação é a ativação da molécula C1q na via do complemento, levando à opsonização de patógenos, participando ativamente da resposta imune à infecção (LEVINSON; WASSERMAN, 2022). A identificação dos níveis de PCR pode ser um importante marcador indireto de infecções virais e um indicador da progressão da infecção e eficácia do tratamento (ISA et al.2022).

**3.3 Haptoglobina (Hp)** pertence à família das proteínas plasmáticas de fase aguda e representa o mais importante desintoxicante plasmático da hemoglobina (Hb). Como o gene *Hp* humano é caracterizado por dois alelos Hp1 e Hp2 comuns, três genótipos principais podem resultar (ou seja, Hp1-1, Hp2-1 e Hp2-2). De fato, as propriedades antioxidantes e de ligação à Hb do Hp, bem como sua capacidade de estimular as células da linhagem de monócitos/macrófagos e modular o equilíbrio de células T auxiliares tipo 1 e tipo 2 associam-se significativamente a uma variedade de distúrbios patogênicos (por exemplo, doenças infecciosas, diabetes, doenças cardiovasculares e câncer). Funções alternativas das variantes Hp1 e Hp2 foram relatadas, particularmente na suscetibilidade e proteção contra doenças infecciosas (por exemplo, tuberculose pulmonar, HIV e malária) e não infecciosas (por exemplo, diabetes, doenças cardiovasculares e obesidade). Tanto níveis altos quanto baixos de Hp são indicativos de condições clínicas: os níveis plasmáticos de Hp aumentam durante infecções, inflamação e várias doenças malignas, e diminuem durante desnutrição, hemólise, doença hepática, reações alérgicas, e distúrbios convulsivos (MASI et al. 2020).

**3.4 Ceruloplasmina**- contém 95% do cobre no soro humano e desempenha um papel importante no efluxo de ferro de células de mamíferos, incluindo células cerebrais, devido à atividade da ferroxidase, que oxida o ferro ferroso após sua transferência para a superfície celular através do transportador de ferro, ferroportina, e fornece ferro férrico para transferrina extracelular. No sistema nervoso central, descobriu-se que uma ceruloplasmina ancorada em glicosilfosfatidilinositol (GPI) ligada às membranas celulares dos astrócitos é a principal isoforma dessa proteína. A perda hereditária da proteína causa aceruloplasminemia, que é um distúrbio autossômico recessivo caracterizado por neurodegeneração progressiva da retina e gânglios da base associada às mutações herdadas específicas no gene *ATP7B* da ceruloplasmina. A aceruloplasminemia é classificada como um distúrbio neurodegenerativo hereditário chamado "neurodegeneração com acúmulo de ferro no cérebro" (NBIA) devido a defeitos genéticos associados ao metabolismo do ferro (KONO, 2012).

**3.5 Albumina** – A albumina, um reagente negativo de fase aguda, tem um papel na manutenção da pressão plasmática oncótica e efeitos anti-inflamatórios (ŞAYLdK et al 2023). A albumina desempenha um papel crítico em uma ampla gama de processos patológicos; (CHEN et al. 2021). É frequentemente definida como um indicador de estado nutricional, no entanto, hipoalbuminemia pode refletir reação de fase aguda mediada por citocinas durante um evento inflamatório (CABRAL et al. 2001).

**3.6 Proteínas do complemento C3 e C4** –O sistema complemento, um componente central da imunidade inata, provoca respostas pró-inflamatórias durante infecções virais (BAGHERIMOGHADDAMB et al. 2022). Os níveis séricos de C3 e C4 são características hereditárias, mesmo em indivíduos sem doenças imunológicas (YANG et al. 2012). A importância do C4 na imunidade também pode ser inferida a partir dos mecanismos virais de antagonismo. Nos flavivírus, a proteína NS1 liga C4 e recruta C1s, causando clivagem de C4 em solução e reduzindo assim a deposição de superfície (BOTTERMANN et al. 2019).

Moléculas com atividades imunomoduladoras foram encontradas na saliva de todos os artrópodes hematófagos, como por exemplo os *Aedes*, como parte dessa imunomodulação, os artrópodes vetores possuem em seus intestinos e/ou saliva, moléculas anti-complemento para neutralizar a ativação do complemento, um dos principais mediadores das respostas imunes inatas dos vertebrados, (PEREIRA-FILHO et al. 2020).

**3.7 Ferritina.** As proteínas de fase aguda envolvidas no controle do ferro livre incluem o hormônio peptídico circulante hepcidina, ferritina, haptoglobina e hemopexina, que

são regulados positivamente na reação de fase aguda. De fato, uma alta concentração plasmática de ferritina é observada em pacientes com condições inflamatórias patológicas graves, incluindo síndrome de ativação de macrófagos, choque séptico e Covid-19, nos quais a ferritina é usada como marcador de gravidade e prognóstico (MANTOVANI; GARLANDA, 2023). Foram descobertas, associações positivas robustas entre ferritina sérica, interleucina 6 (IL-6), fator de necrose tecidual-alfa (TNF- $\alpha$ ) e proteína C reativa de alta sensibilidade (hsCRP) (DEPALMA; HAYES; OLEARY, 2021).

**3.8 Transferrina** beta-globulina de síntese essencialmente hepática, cuja função principal é o transporte de ferro, apresenta baixa sensibilidade e especificidade quando analisada de forma individual, estando os seus níveis aumentados na anemia ferropriva e diminuído em doenças hepáticas, sepse, má absorção e alterações inflamatórias (MAICÁ; SCHWEIGERT, 2008). É uma proteína de fase aguda negativa que é regulada negativamente durante a fase aguda (MANTOVANI; GARLANDA, 2023). Quanto maior o componente inflamatório da doença do paciente, menor será a concentração de transferrina e a capacidade ferropéxica e maior será a ferritina (FIGUEIREDO, 2010).

#### **4 JUSTIFICATIVA**

Fatores individuais específicos do hospedeiro como fatores inflamatórios e imunes podem ser úteis para o manejo clínico no processo de tomada de decisão em saúde além de avaliar diagnóstico, tratamento, prognóstico, gravidade e possível papel no surgimento de complicações clínicas.

## 5. OBJETIVOS

### 5.1 Geral

Descrever o perfil de proteínas pró-inflamatórias e de citocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias em mulheres com infecção por vírus Zika atendidas em uma unidade de saúde referência em doenças infecciosas em Manaus, Amazonas.

### 5.2 Específicos

- Quantificar os níveis de biomarcadores positivos como alfa1-glicoproteína ácida, ceruloplasmina, haptoglobina, proteínas do complemento C3 e C4, proteína C reativa e ferritina. Quantificar biomarcadores negativos como albumina e transferrina.
- Quantificar os níveis de 26 citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias tais como: Eotaxina, TGF- $\alpha$ , CSF-GM, CSF-G, fractalquina, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1ra, IL-9, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF.
- Quantificar os níveis de enzimas hepáticas (gama glutamil transferase ( $\gamma$ -GT), Alanino aminotransferase (ALT), Aspartato aminotransferase (AST) e bilirrubinas total, direta e indireta).
- Avaliar a função renal dessas pacientes por meio da dosagem de uréia e creatinina.
- Quantificar os níveis de IgM detectável nessas pacientes e os níveis de Lactato desidrogenase (Ldh) para auxiliar na avaliação de possível comprometimento tecidual.

## **6. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **6.1 Tipo de Estudo**

Estudo descritivo, tipo série de casos de mulheres com infecção por vírus Zika.

### **6.2 Área de Estudo**

O presente estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), em Manaus, Amazonas.

### **6.3 Aspectos Éticos**

Este projeto faz parte do estudo “Prevalência de infecção por arbovírus em pacientes com doença exantemática aguda atendidos em uma unidade terciária de saúde em Manaus – Amazonas”, estudo ARBO, aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FMT-HVD, com Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE) de número 80961517.6.000.0005.

### **6.4 População de Estudo**

O estudo foi realizado na Fundação de Medicina Tropical Doutor Heitor Vieira Dourado (FMT-HVD), hospital referência em patologias tropicais em Manaus, Amazonas, em mulheres que buscaram de forma espontânea a fundação por apresentarem exantema agudo no período de fevereiro de 2018 a maio de 2019. O grupo controle positivo consta de amostra de mulheres exantemáticas positivas para Zika vírus e o grupo controle negativo mulheres com quadro exantemático negativas para a doença.

### **6.5 Critérios de elegibilidade**

Indivíduos de sexo feminino com idade entre 20 e 45 anos, que participaram do estudo ARBO.

### **6.6 Seleção dos participantes do estudo ARBO e obtenção de amostras biológicas**

Pacientes que buscaram de forma espontânea a FMT-HVD e que apresentavam quadro exantemático com suspeita diagnóstica de arbovirose e idade superior a 18 anos, no período de fevereiro de 2018 a maio de 2019, foram convidados a participar do estudo ARBO. Após o processo do consentimento e assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), os participantes eram entrevistados, avaliados por médicas da equipe e amostras biológicas eram coletadas.

Foram coletadas três amostras de sangue venoso periférico em tubo contendo anticoagulante EDTA (ácido etileno diamino tetra-acético) para avaliação de infecções que cursam com exantema agudo, das citocinas e quimiocinas e do padrão hematológico por meio do hemograma. Foi solicitado também que o paciente coletasse uma amostra de urina para avaliação de infecção pelos vírus Zika, Chikungunya e sarampo. No caso das participantes do sexo feminino, foi realizado um teste rápido de gravidez. Em caso de resultado positivo, a referida participante era encaminhada para serviço de referência.

As amostras receberam identificação, foram refrigeradas e posteriormente processadas. Após esses procedimentos, foi agendada uma consulta de retorno no prazo de 48 horas após a coleta para que o paciente recebesse os resultados dos testes, conduta clínica e devido aconselhamento em caso de resultado positivo.

### **6.7 Identificação de infecções que cursam com exantema agudo**

A infecção pelos vírus Zika, Dengue e Chikungunya foi avaliada por meio da realização de detecção viral por meio da reação da transcriptase reversa, seguida de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) utilizando o kit ZDC de Tecnologia em Imunobiológicos/Bio-Manguinhos/Fiocruz.

O ácido nucléico total viral (RNA e DNA) foi isolado e purificado nas amostras biológicas coletadas com kit comercial que utiliza *beads* magnéticas, em plataforma automatizada (Maxwell® 16 Viral Total Nucleic Acid Purification Kit, Promega), para a utilização nos ensaios biomoleculares. A infecção pelos vírus Zika e Chikungunya foi avaliada por meio da detecção viral no plasma e urina, e o vírus Dengue somente no plasma sanguíneo.

A infecção pelos vírus Mayaro e Oropouche foi avaliada por meio da detecção viral no plasma sanguíneo e, para o vírus do Sarampo, além do plasma foi utilizado também a urina. As reações (RT-qPCR) foram otimizadas na Gerência de Virologia da FMT-HVD, em que foi utilizado o kit de reagentes comercial (GoTaq® Probe 1-Step RT-qPCR System, Promega), amplificados em sistema de PCR em tempo real QuantStudio 5 (Applied Biosystems), segundo os protocolos.

A infecção pelo vírus Parvovírus B19, Epstein-Barr, Citomegalovírus, Sarampo e Rubéola foi avaliada por meio da detecção qualitativa de anticorpos da classe IgM pelo método imunoenzimático (ELISA), utilizando-se os kits comerciais (Euroimmun, Lübeck, Germany), de acordo com as orientações e recomendações do

fabricante. As amostras reagentes e indeterminadas foram avaliadas pelo método eletroquimioluminescência (ECLIA), utilizando-se kits comerciais para o equipamento LIAISON (Diasorin), a fim de se estabelecer a confirmação para os testes laboratoriais por imunodiagnóstico. A infecção por sarampo foi avaliada também por meio de RT-qPCR em amostras de plasma e urina.

A infecção pelo vírus HIV foi avaliada por meio da determinação qualitativa de anticorpos de anti-HIV-1 e anti-HIV-2 com testes rápidos (TR) imunocromatográficos. A presença de resultados reagentes em dois TR diferentes era definida com infecção viral pelo HIV confirmada (98). Os kits comerciais de TR utilizados foram o HIV TRI LINE (Bioclin) para a triagem, e o TR DPP® 1/2 (Bio-Manguinhos) como confirmatório, conforme preconizado e distribuído pelo Ministério da Saúde do Brasil.

A infecção por sífilis foi avaliada por meio da realização de TR comercial Immuno-Fast Syphilis (Wama Diagnostic) e confirmado com a quantificação de títulos de anticorpos contra sífilis por meio do VDRL (*Venereal Disease Research Laboratory*).

## **6.8 Avaliação dos níveis de proteínas pró-inflamatórias e funções hepática e renal**

As análises de biomarcadores de proteínas pró-inflamatórias e função hepática e função renal foram realizadas em amostras de plasma com EDTA/K<sup>3</sup> (tri-potássico – ácido etilenodiamino tetra-acético) mantidas em temperatura de -80°C em refrigerador que se encontra no setor de Virologia da Fundação e Medicina Tropical de Manaus, em seguida descongelada e colocada em caixa de transporte de amostras biológicas e transportadas para realização de biomarcadores no laboratório de análises clínicas da FCECON (Fundação Centro de controle de Oncologia de Estado do Amazonas).

Antes da realização das análises no equipamento C-8000, os testes foram calibrados com calibrador APTEC Lot: AL05672 (para reagentes  $\alpha$ 1- glicoproteína ácida, haptoglobina, transferrina, C3, C4, proteína C reativa e IgM) passado controle contido na caixa do calibrador APTEC do mesmo lote. E para reagentes Albumina, LdH, TGO, TGP,  $\gamma$ GT, Uréia e creatinina, foram calibrados com TruKal U Lot: 10778321168 e passado controle TopKon Lot: 10778021175 do próprio fabricante ABBOTT e realizado no mesmo equipamento. Para dosagem de ferritina, foi feito no equipamento I-2000 analisador de imunoensaio, foi calibrado com reagente ABBOTT



Lot:25389ud00 e passado controle Lyphocheck Lot:40400 de 03 níveis Todos os testes são liberados para qualquer análise mediante estarem na média no gráfico de *Leyey-Jennings*, grande aliado no controle de qualidade nas análises analíticas.

As amostras foram adicionadas em cubetas (*sample cup*) com volume de 300 $\mu$ L em cada copo para análises nos 2 equipamentos, o analisador bioquímico C-8000 e logo que processado levado com as mesmas racks com as amostras para o analisador imunológico i-2000. Os resultados foram adicionados em banco de dados em planilha do Excel para posterior análises estatísticas.



Figura 6. Amostra em *sample cup* para análise.

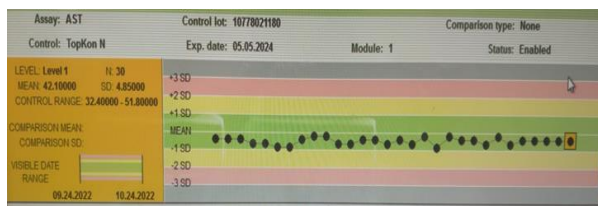


Figura 07: Gráfico de Levey-Jennings – Equipamento C-8000- controle de AST

$\alpha$ 1-glicoproteína ácida e transferrina apresentaram kit bi-reagente da marca ABBOTT método turbidimétrico; ceruloplasmina, haptoglobina kit bi-reagente da marca APTEC método imunoturbidimétrico; C3 e C4 kit bi-reagente da marca Kovalente método imunoturbidimétrico; Albumina Kit monoreagente método colorimétrico verde-bromocresol, proteína C reativa kit bi-reagente método turbidimétrico. Ainda as transaminases, uréia, creatinina todos bi-reagentes da marca ABBOTT e LdH (lactato desidrogenase) e  $\gamma$ -gt (gama glutamil transferase) do fabricante Kovalente, todos bi-reagentes. A dosagem de ferritina que foi realizado no equipamento Architect i-2000sr, com apresentação do reagente com 1 frasco de micropartículas revestido com anticorpo antiferritina e 1 frasco de conjugado com anticorpo antiferritina marcado de acridina ambos do fabricante ABBOTT (Quadro 3).

## **6.9 Avaliação dos níveis de citocinas pró-inflamatórias, citocinas anti-inflamatórias, quimiocinas e fatores de crescimento**

As dosagens de 26 citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (eotaxina, TGF- $\alpha$ , CSF-GM, CSF-G, fractalquina, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1ra, IL-9, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF), foram realizadas no equipamento MILLIPLEX MAP – Multiplexing Assays com tecnologia imunoensaio Luminex, com o kit comercial MILLIPLEX®MAP Human Cytokine/ Chemokine Magnetic Bead Panel, Kit Lot # 3790645 – made in USA, que se encontra na Fundação de Medicina Tropical – Dr Heitor Vieira Dourado – FMT-HVD, utilizando a alíquota das amostras analisadas.

## **6.10 Análises estatística**

Os resultados das proteínas e citocinas inflamatórias foram expressos como mediana e analisados estatisticamente com o programa GraphPad Prism versão 5 (Graphpad software, San Diego, CA, USA). A comparação entre os níveis de PCR, ferritina e citocinas dos pacientes ZIKV positivos com o grupo controle, foi realizada por teste não paramétrico, Mann-Whitney U test, com Intervalo de Confiança de 95% (IC95). A análise dos níveis de PCR, ferritina e citocinas nas fases aguda e convalescente foi feita por teste T pareado. A correlação entre os níveis de PCR e citocinas versus a quantidade de manifestações clínicas foi realizada pela correlação não-paramétrica de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando  $p < 0,05$ .

Todas as análises estatísticas foram conduzidas usando pacotes estatísticos disponíveis no software R (4.2.2). As concentrações de citocinas e proteínas plasmáticas foram comparadas entre pacientes negativos e positivos para Zika vírus usando a média ajustadas por idade usando o método de modelo linear geral usando pacote stats (4.3.0). As análises de correlações entre as citocinas foram feitas usando o método de Spearman usando o pacote corrplot (0.92). Análises de componente principal foram realizadas usando factoextra (1.0.7). As análises de rede a partir das correlações de Spearman foram realizadas usando o pacote ggraph (2.1.0).

## 7. RESULTADOS

### 7.1 População de estudo

A população do estudo foi composta por 104 mulheres, com mediana de idade de 32 anos. Desse total, 61 mulheres (58,65%) foram diagnosticadas com vírus Zika e 43 mulheres (41,34%) foram negativas para todas as infecções pesquisadas (figura 8). A mediana de idade das mulheres com infecção pelo vírus Zika foi de 27 anos e a mediana de idade das mulheres negativas para todas as infecções pesquisadas foi de 34 anos. Durante o processo da seleção das participantes, nenhuma relatou fazer tratamento para doença autoimune ou outro tipo de patologia.

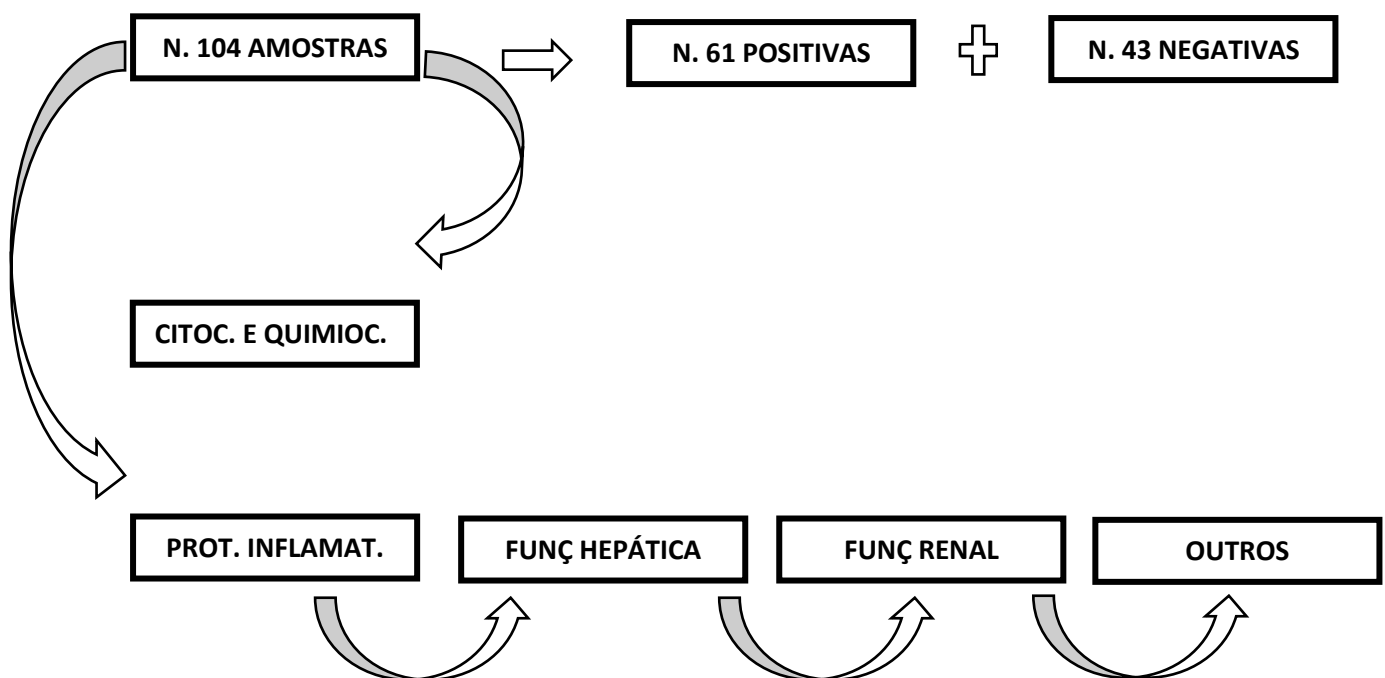


Figura 8. Fluxograma do estudo.

### 7.2 Dosagem de proteínas inflamatórias

Em todas as amostras foram dosadas citocinas e quimiocinas, biomarcadores inflamatórios positivos e negativos, analitos que avaliaram a função hepática e renal dessas pacientes e ainda outros testes adicionais como Lactato desidrogenase (LdH) e IgM.

Nas análises de biomarcadores inflamatórios positivos, nos controles positivos para a arbovirose, apenas a proteína C reativa das amostras analisadas apresentaram resultados com valores acima da faixa de referência ( $vr \leq 0,5$  mg/dL) com  $\bar{x} = 0,9684$  mg/dL e nos testes adicionais somente o  $\gamma$ -GT com  $\bar{x} = 45,62$  mg/dL ( $vr: <38$  mg/dL) também apresentaram com valores alterados. Os outros biomarcadores inflamatórios positivos analisados alfa-1glicoproteína ácida ( $\bar{x} = 115,3$  mg/dL), haptoglobina ( $\bar{x} = 164,3$

mg/dL), ceruloplasmina ( $\bar{x}$ =32,55 mg/dL), C3 ( $\bar{x}$ =112,6 mg/dL), C4 ( $\bar{x}$ =33,83mg/dL), ferritina ( $\bar{x}$ =144,8 ng/mL) apresentaram dentro das faixas de referência de cada teste. Nos biomarcadores inflamatórios negativos analisados, a albumina ( $\bar{x}$ = 4,67g/dL) e transferrina ( $\bar{x}$ = 248,1mg/dL) apresentaram também dentro do intervalo de referência, o que ocorreu nos testes que avaliaram a função renal como uréia ( $\bar{x}$ = 24,0 mg/dL), creatinina ( $\bar{x}$ = 0,89 mg/dL) e testes de função hepática como bilirrubina total ( $\bar{x}$ =0,24mg/dL), bilirrubina direta ( $\bar{x}$ =0,10mg/dL), aspartato aminotransferase- AST ( $\bar{x}$ = 32,46 U/L) e alanina aminotransferase- ALT ( $\bar{x}$ = 42,39 U/L). E nos outros marcadores que adicionamos no estudo que consideramos como testes adicionais realizados como IgM ( $\bar{x}$ = 142,4 mg/dL), lactato desidrogenase- LdH ( $\bar{x}$ = 378,9 U/L) também apresentaram sem nenhuma alteração em seus valores.

Tabela 3. Avaliação laboratorial das funções hepática e renal e do comprometimento tecidual.

	Zika positivo (n=61)		Zika negativo (n=43)		Adj.P-valor	AIC
	Média	Erro padrão da média	Média	Erro padrão da média		
Alf. Glic. Ac. (mg/dL)	115.3	2.489	133.2	6.937	0.001	1010
Hapto (mg/dL)	164.3	5.671	190.7	9.650	0.02	1114
Transferr (mg/dL)	248.1	4.754	251.2	7.039	0.266	1057
Cerulopl (mg/dL)	32.55	0.6250	33.13	0.9695	0.1914	643.8
C3 (mg/dL)	112.6	2.572	118.9	4.093	0.07	940.9
C4 (mg/dL)	33.83	2.086	33.54	2.551	0.6186	871.5
IgM (mg/dL)	142.4	7.473	146.8	9.359	0.9502	1139
PCR (mg/dL)	0.9684	0.1331	2.1029	0.4316	0.002	434.1
LDH (U/L)	378.9	15.44	462.1	38.13	007	1370
Albumina (g/dL)	4.679	0.04103	5.729	1.00078	0.3591	590.3
Ferritina (ng/mL)	144.8	66.20	176.3	39.73	0.9922	1547
GGT (mg/dL)	45.62	9.229	58.49	13.572	0.1686	1195
ALT (U/L)	42.39	5.704	49.40	7.139	0.6711	1083
AST(U/L)	32.46	5.404	42.74	9.664	0.5806	1109
BT (mg/dL)	0.2416	0.01588	1.4343	0.96995	0.2594	583.6
BD (mg/dL)	0.141	0.00855	0.269	0.07624	0.03	62.18
BI (mg/dL)	0.1007	0.01012	1.1652	0.96718	0.3368	582.9
Urea (mg/dL)	24.02	0.8711	25.36	1.3225	0.1151	703.7
Creatinina (mg/dL)	0.8905	0.01802	0.9088	0.02262	0.27900	-104.2

Nos pacientes controle arbovírus negativos analisados, houveram uma discreta elevação nos biomarcadores positivos  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida ( $\bar{x}$ = 133,2 mg/ dL), e na proteína C reativa os valores das médias dos pacientes foram 4 vezes maiores ao valor de referência do teste ( $\bar{x}$ = 2,1029 mg/dL), e nos testes adicionais, somente a  $\gamma$ -gT apresentou com alterações nos valores ( $\bar{x}$ = 58,49 mg/dL). Nos testes de funções hepática, o AST apresentou leve variação  $\bar{x}$ = 42,74 U/L (vr: 5-34 U/L), bilirrubina total  $\bar{x}$ = 1,43 mg/dL (vr: 0,2-1,2 mg/dL) e bilirrubina indireta  $\bar{x}$ =1,16 mg/dL. Nos outros biomarcadores inflamatórios positivos como haptoglobina, ceruloplasmina, proteínas

do complemento C3 e C4, ferritina e nos biomarcadores inflamatórios negativos como albumina e transferrina, todos analitos não apresentaram alterações, assim como nos demais testes realizados (IgM, uréia, creatinina, alanina aminotransferase (ALT), lactato desidrogenase (LdH), bilirrubina direta (BD), todas apresentaram dentro dos valores de referência para cada teste. Os resultados estão dispostos na tabela 3.

### 7.3 Comparações de citocinas entre pacientes Zika positivo e Zika negativo

Nas análises de 26 citocinas, quimiocinas e fatores do crescimento, no Gráfico comparativo de *Jitter-plot*, encontramos valores de níveis de citocinas em pacientes exantemáticos Zika positivos foram mais significativos ( $p < 0,005$ ) nas IL-8 ( $0,02252$ ), IP-10 ( $5,789 \times 10^{-7}$ ), IL-1ra ( $0,01355$ ) e MCP-1 ( $0,0433$ ) em comparação com valores de pacientes exantemáticos Zika negativo, outras apresentaram valores não significantes (n.s) descritas, estavam diminuídos. O quadro comparativo completo encontra-se em anexo (Figura 9B).

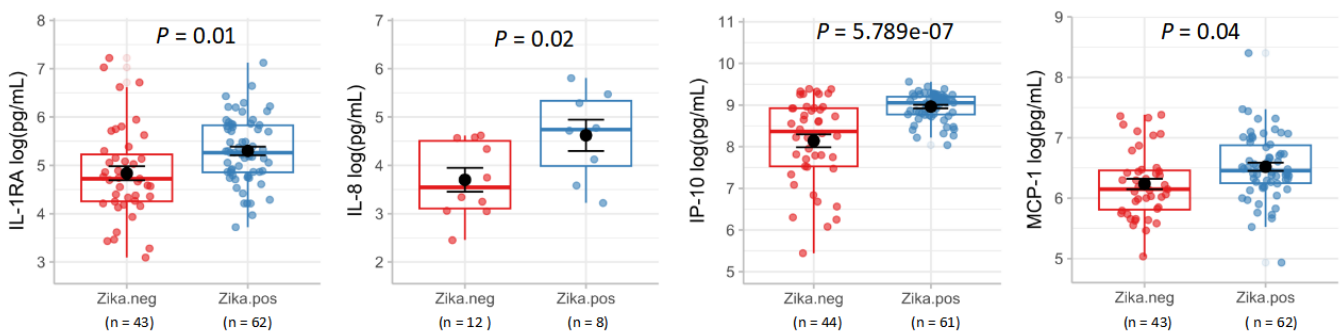


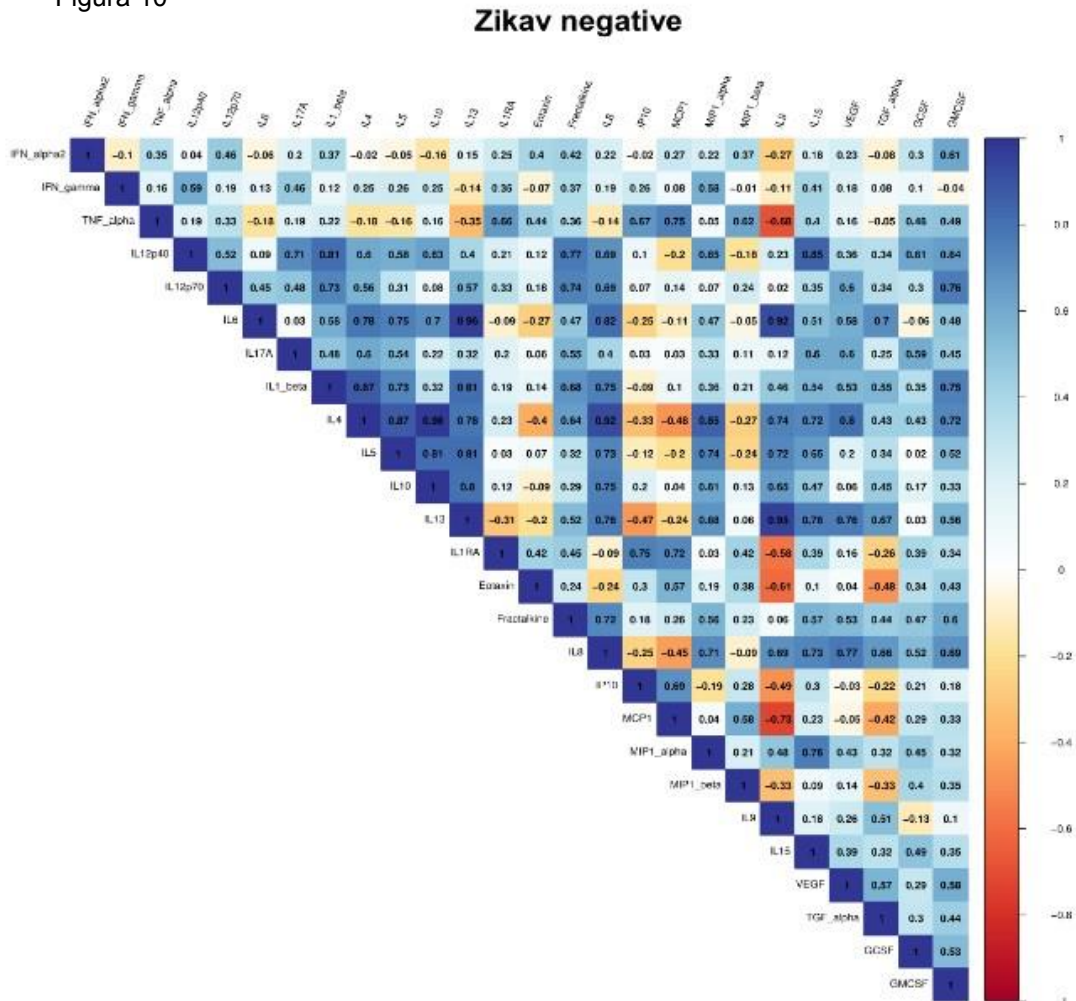
Figura 9 A. Comparações de citocinas entre Zika positivos e Zika negativos. Os gráficos mostram a mediana, quartil superior e inferior, valores mínimos e máximos para controles positivos versus controles negativos (teste de Mann-Whitney). Os valores de  $P < 0,05$  são considerados significantes.

### 7.4 Correlações de Spearman entre os grupos Zika positivo e Zika negativo

Nas análises de correlações de citocinas, quimiocinas e fatores do crescimento secretadas no plasma entre as pacientes exantemáticas Zika negativos, observamos através do gráfico de Spearman (Figura 10), que as interleucinas IL-4, IL-5, IL-13 e IL-8 foram as citocinas predominantes que mais apresentaram forte correlações positivas ( $\rho \geq 0,7$ ), com as demais citocinas. As fortes correlações entre IL-4 foram IL-4/IL5 ( $0,87$ ), IL-4/IL-10 ( $0,98$ ), IL-4/IL-13 ( $0,78$ ), IL-4/IL8 ( $0,92$ ), IL-4/MIP-1 $\alpha$  ( $0,85$ ), IL-4/IL-9 ( $0,74$ ), IL-4/IL-15 ( $0,72$ ), IL-4/GM-CSF ( $0,72$ ), IL-4/IL-6 ( $0,78$ ), IL-4/ VEGF ( $0,80$ ) e IL/4IL-1 $\beta$  ( $0,87$ ). Fortes correlações positivas entre IL-8 foram IL-8/MIP1-  $\alpha$  ( $0,71$ ), IL-

8/IL-15 (0,73), IL-8/IL-VEGF (0,77), IL-8/IL-06 (0,82), IL-8/IL-1 $\beta$  (0,75), IL-8/IL4 (0,92), IL-8/IL-5 (0,73), IL-8/IL-10 (0,75), IL-8/IL-13 (0,76), IL-8/Fractalquina (0,72). Com a citocina IL-5 foram IL-5/IL-6 (0,75), IL-5/IL-1 $\beta$  (0,73), IL-5/IL-4 (0,87), IL-5/IL-10 (0,81), IL-5/IL-13 (0,81), IL-5/IL-8 (0,73), IL-5/IL-MIP1- $\alpha$  (0,74), IL-5/IL-9 0,72, e com IL-13; IL-13/IL-6 (0,96), IL-13/IL-1 $\beta$  (0,81), IL-13/IL-4 (0,78), IL-13/IL-5 (0,81), IL-13/IL-10 (0,80), IL-13/IL-8 (0,76), IL-13/VEGF (0,76), IL-9 (0,95) e IL-13/IL-15 (0,76).

Figura 10



Nas pacientes exantemáticas com infecção pelo Zika Vírus (Figura 11), apresentaram predominantemente, fortes correlações positivas ( $\rho \geq 0,7$ ) com as citocinas IL-1 $\beta$ ; IL6, IL-4, IL-5 e IL-13. As correlações positivas com formação de pares entre IL1 $\beta$  com as citocinas e IL1 $\beta$ /IL-6, IL1 $\beta$ /IL-17A, IL1 $\beta$ /IL-4, IL1 $\beta$ /IL-5, IL1 $\beta$ /IL-13, IL1 $\beta$ /IL-8, IL1 $\beta$ /IL-9, IL1 $\beta$ /IL-15, IL1 $\beta$ /TGF- $\alpha$ , IL1 $\beta$ /GM-CSF A IL-6 foi fortemente correlacionada formando pares com IL-6/IL-12p40, IL-6/IL-1 $\beta$ , IL-6/IL-4, IL-6/IL-5, IL-6/IL-10, IL-6/IL-13, IL-6/MIP1- $\alpha$ , IL-6/IL-9, IL-6/IL-15, IL-6/VEGF, IL-6/GM-CSF. A IL-4 correlacionou formando pares com as citocinas IL-4/IL-12p40, IL-4/IL-6, IL-4/IL-1 $\beta$ , IL-4/IL-5, IL-4/IL-10, IL-4/IL-13, IL-4/IL-8, IL-4/MIP1- $\alpha$ , IL-4/IL-9, IL-4/IL-15,

IL-4/GM-CSF. Correlações positivas em pares entre IL-5 com as citocinas IL-5/IL-12p40, IL-5/IL-6, IL-5/IL-1 $\beta$ , IL-5/IL-4, IL-5/IL-10, IL-5/IL-13, IL-5/IL-8, IL-5/MIP1- $\alpha$ , IL-5/IL-9 e IL-5/IL-15. Correlações positivas com IL-13 com IL-13/IL-12p40 (0,86), IL-13/IL-6 (0,96), IL-13/IL-1  $\beta$  (0,90), IL-13/IL-4 (0,95), IL-13/IL-5 (0,91), IL-13/IL-10 (0,94), IL-13/IL-8 (0,80), IL-13/IL-9 (0,96) e IL-13/IL-18 (0,85).

Figura 11

Zikav positivo

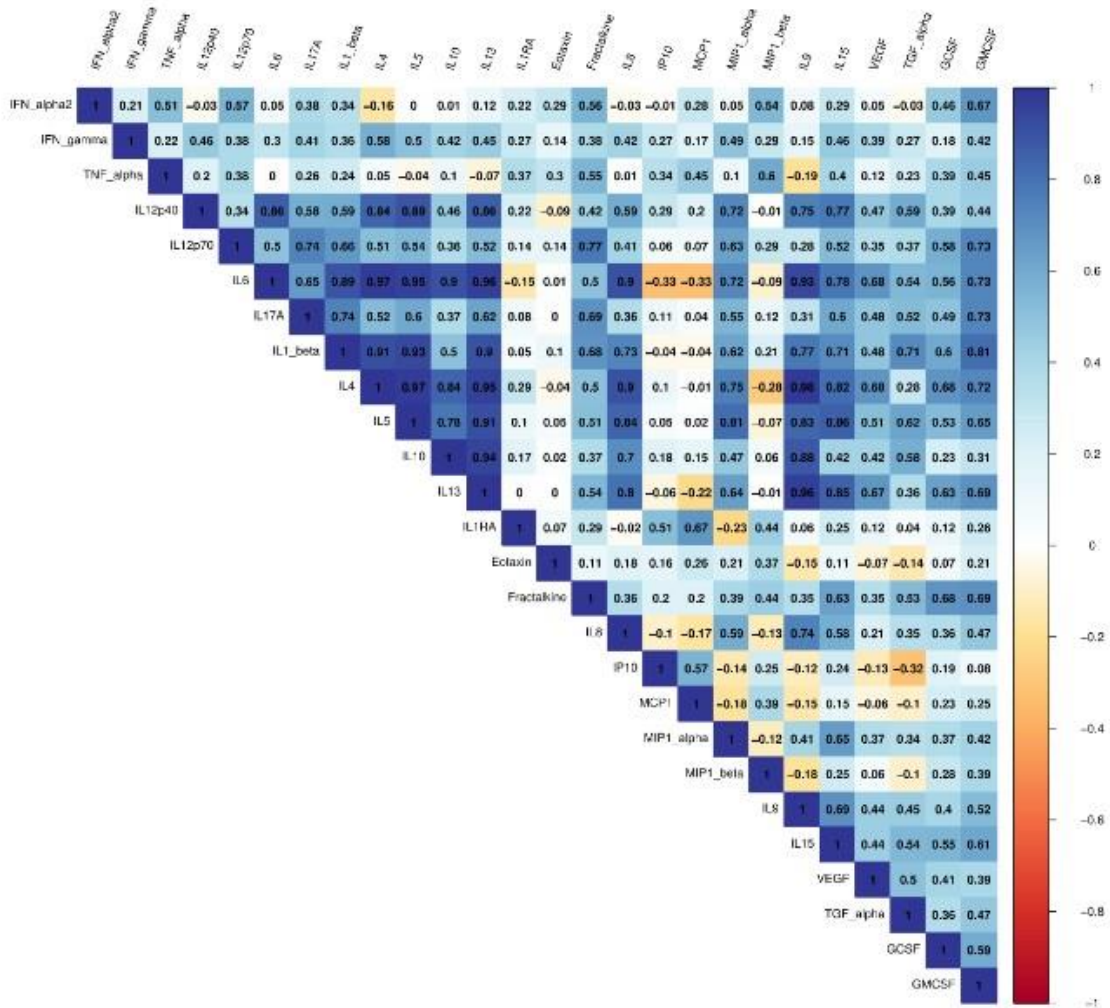


Figura 10 e 11 - Matrizes de correlação entre quimiocinas, citocinas e fatores de crescimento entre os grupos de pacientes com Zika Negativo (controle Negativo) (A) e Zika positivo (controles positivos) (B). Valores crescentes são representados por códigos de cores: azul para correlação positiva e vermelho para correlação negativa. Significância: p < 0,05.

## 7.5 Análise de rede das citocinas

As correlações das 26 citocinas baseadas em Spearman foram observadas em análises de rede (network analysis) entre os pacientes Zika positivo (Figura 12) e Zika negativo (Figura 13). Correlações positivas são exibidas em azul e correlações negativas em vermelho. O Spearman rank (coef.corr) é exibido pela espessura das conexões entre os nodos.

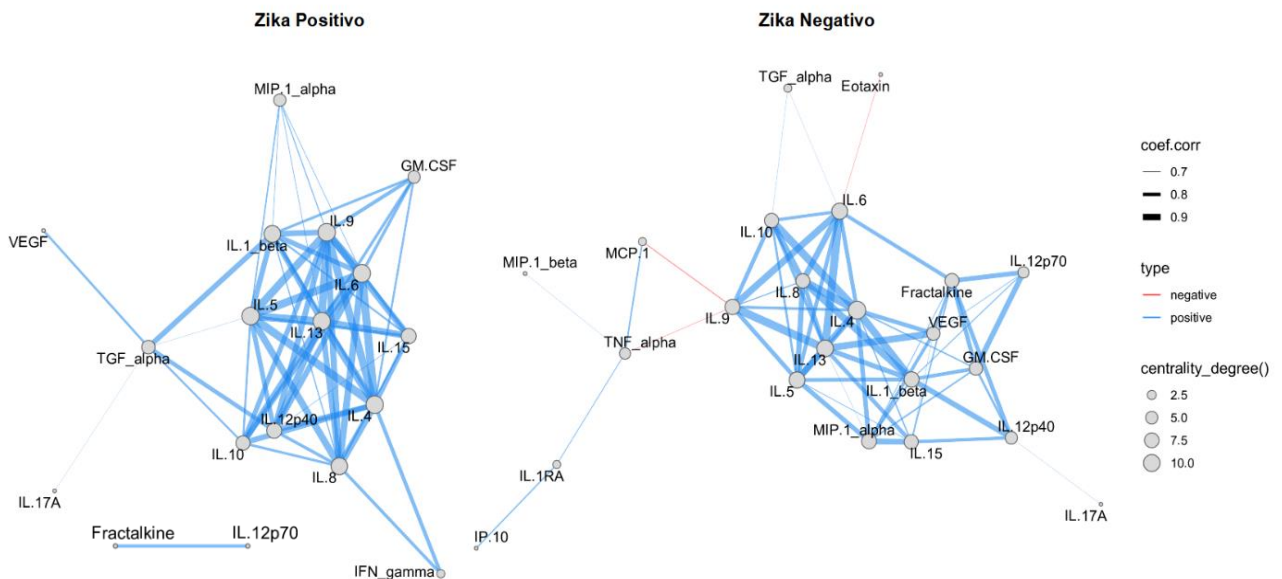


Figura 12 e 13: Análise de rede das 26 citocinas entre pacientes Zika positivos e Zika negativos. A espessura das conexões (coef.corr) representam os valores do coeficiente rho  $\geq 0.7$  das correlações de Spearman, as cores vermelho (correlação negativa) e azul (correlação positiva) (type) representam os tipos de correlações. O grau de centralidade (centrality\_degree) exibe os nodos com mais conexões.

Entre os pacientes Zika positivo observamos fortes relações entre os marcadores pro-inflamatórios IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL-8 e anti-inflamatórios IL-9, IL-4, IL-13, IL-5, IL-10, IL-15, IL-6 (Figura 12). Enquanto nos pacientes Zika negativos, também foram observadas fortes relações entre IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15 VEGF, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL12-p70, GM-CSF e Fractalquina (Figura 13). Somente no grupo de pacientes Zika negativos podemos observar relações negativas, entre IL-9 e as citocinas TNF- $\alpha$  e MCP-1, e entre Eotaxina e IL-6.

Nos pacientes com Zika negativo, o fator de crescimento VEGF apresentou mais relações com outros marcadores, o que não se observou em pacientes Zika positivo (Figura 12). IFN- $\gamma$  mostrou relações positivas com as citocinas IL-8 e IL-9 nos pacientes Zika positivos, diferente do grupo de pacientes Zika negativos onde não foi observada nenhuma relação. Fortes relações positivas de IL-12p70 com Fractalquina e GM-CSF foram observadas no grupo Zika negativo, em contraste ao grupo Zika positivo.



De acordo com o grau de centralidade, tanto os pacientes Zika positivo quanto Zika negativo mostraram relevante papel dos marcadores IL-4, IL-5, IL-6, IL-9 e IL-13 mostrando um perfil de resposta Th2/Th9, em contraste, IL-1 $\beta$  e IL-8 mostraram mais centralidade em Zika positivo do que em Zika negativo.

Nas correlações de controle positivo e negativos, embora em pacientes com Zika haja presença de maiores números citocinas com expressões, encontramos em ambos controles resposta pró-inflamatória Th1 e a presença também de uma resposta antagônica do tipo Th2 que possivelmente seja pela presença de exantema, mas também pelo reparo tecidual em ambos os controles tanto positivo quanto o controle negativo, mas também há a presença de uma resposta tipo Th9.

## 8. DISCUSSÃO

Doenças tropicais, como as arboviroses, são um grupo de doenças negligenciadas em todo mundo encontrada principalmente em países mais pobres como da África, Ásia e América latina. A falta de diagnóstico rápido para a identificação e posteriormente o início de um tratamento correto, ainda causam grande preocupação e nas arboviroses presentes na amazônica não é diferente, e o pior é um diagnóstico não específico tanto laboratorial quanto clínico dependendo da fase evolutiva da doença ocorre muito nessa região do país.

Apesar de vários estudos avançados sobre o mecanismo de ação e de defesa do vírus Zika no corpo humano e em animais, ainda não existe vacina contra o vírus. A predileção do vírus por células dos fibroblastos dérmicos quanto pelos queratinócitos epidérmicos são alvos da infecção pelo ZIKV, potencialmente transmitindo a infecção às células dendríticas dérmicas e comprometendo outros organismos com o decorrer do curso da doença.

Em nossos estudos de proteínas inflamatórias e outras dosagens de analitos como função hepática e renal, encontramos tanto nos controles Zika positivos quanto nos controles negativos ambos exantemáticos, a elevação de proteína C reativa (CP:  $\bar{x}=0,9684$ ; CN:  $\bar{x}=2,1029$  mg/dL) ( $p<0,02$ ). Em pacientes com vírus Zika a presença de proteína C reativa foi menos elevada em comparação com Zika negativo. Isto pode estar relacionado ao aumento do IL-1ra em Zika positivos ao passo que nos pacientes Zika negativos a IL-1ra encontram-se diminuídas. IL-1ra é conhecido por regular a IL-1 $\beta$ . O IL-1ra pode ter ocasionado uma regulação negativa de IL-1 $\beta$  nos pacientes com Zika e pode estar relacionada com aumento proteína C reativa nos pacientes Zika negativos (Figura 9 A). Assim como o Zika vírus, outras infecções virais, a identificação dos níveis de PCR pode ser um importante marcador indireto (ISA, et al. 2022). Em nosso controle negativo, o aumento de proteína C reativa também pode ser justificado pelo aumento também de IL-6 que pode ter ocasionado pelo processo inflamatório de pele, no caso o rash cutâneo. A proteína C reativa aumentada, já foi constatada em infecções virais, como na infecção respiratória por adenovírus (BARROS, 2017). Em outro teste realizado de forma adicional, o  $\gamma$ -GT, em CP: ( $\bar{x}= 45,62$  mg/dL) e em CN ( $\bar{x}= 58,49$  mg/dL, apresentaram aumentados, e como já descrito por, *JAVED et al. 2017*, em pacientes positivados por Zika, após o aparecimento dos sintomas, o diagnóstico pode ser feito com a ajuda de vários parâmetros laboratoriais, por exemplo, gama-glutamil transferase ( $\gamma$ -gT), lactato desidrogenase (LdH) sérica e derivados proteicos elevados (proteína C reativa e ferritina), mas em nossos estudos

apenas a proteína C reativa e a gama-glutamil transferase apresentaram alterados como já descrito e todos os outros analitos não apresentaram nenhuma alteração. Mas vale ressaltar que a descrição de alguns relatos de casos como descrito por *MUSSO; GUBLER, 2016*, encontraram em suas pesquisas, alterações das transaminases hepáticas em pacientes com Zika e em outros arbovírus, principalmente dengue (DENV) e Chikungunya (CHIKV). Em outra descrição, de uma paciente previamente saudável, e logo após a infecção por Zika, foram observados infecção indicando lesão hepática. Especificamente, em seus níveis de AST, ALT e LdH (WU et al.2017).

Nos pacientes controle arbovírus negativos, além da elevação de proteína C reativa e de  $\gamma$ -G, outros marcadores como em alfa1-glicoproteína ácida, aspartato aminotransferase (TGO), bilirrubina total e indireta, tiveram discretas elevações, mas com estudos escassos associados ao exantema.

Nas análises do perfil de 26 citocinas e quimiocinas analisadas (eotaxina, TGF- $\alpha$ , CSF-GM, CSF-G, fractalquina, IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p40, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, IL-1ra, IL-9, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP1- $\alpha$ , MIP1- $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF) em mulheres exantemáticas, encontramos em ambos os controles tanto nos controles negativos quanto nos controles positivos, um perfil de respostas celular Th1, Th2 e Th9. Entre mulheres exantemáticas com Zika positivo encontramos citocinas com expressões aumentadas em IP-10 ( $p < 5,789 \times 10^{-7}$ ), IL-1ra ( $p < 0,01355$ ), MCP-1 ( $p < 0,0433$ ) e IL-8 ( $p < 0,02$ ). Nas mulheres exantemáticas com Zika positivo encontramos fortes correlações positivas entre as citocinas IL1 $\beta$ , IL-4, IL-5, IL6, IL8, IL-9, IL-10, IL-13, IL-15 e IL-12p40 ( $\rho \geq 0,7$ ), e nas exantemáticas negativas para Zika a presença de correlações positivas com as citocinas IL-4, IL-5, IL-6, IL-9, IL-8, IL-10, IL-13, IL-15 VEGF, MIP-1 $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-12p40, IL12-p70, GM-CSF e Fractalquina ( $\rho \geq 0,7$ ).

A presença do perfil de citocinas que encontramos em nossos estudos para portadoras de Zika exantemáticas, foi correspondente com encontrado por *Tappe et al, 2015*, que mostraram a predominância significativas de concentração de interleucina (IL) -1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-4, IL-10, IL-13, IL-17 e IL-9 em pacientes com Zika. Exceto a IL-17, todas as interleucinas foram encontradas em nossos estudos havendo uma resposta celular do tipo Th1, Th2 e Th9 como afirmamos no início do texto. A presença das Interleucinas da imunidade inata IL-12p40 e IL-15 ( $\rho \geq 0,7$ ), encontradas em nossa pesquisa, pode ser explicada por que tanto a IL15 quanto a IL-12 são secretadas por células dendríticas e macrófagos que no início do curso de uma

infecção viral, as células NK são expandidas e ativadas pelo reconhecimento de ligantes ativadores presentes nas células infectadas e então matam as células infectadas antes das CTLs (ABBUL; ANDREW; SHIV, 2019). Outra pesquisa realizada por SILVA *et al.* 2019, é que a IL-12 assim como a IL-6 em pacientes com infecção aguda (até 5 dias após o início dos sintomas) por ZIKV apresentaram expressões aumentadas.

Na resposta celular Th9, no grupo controle positivo, a IL-9 ( $\rho \geq 0,7$ ) no gráfico de Spearman (Figura 11), todas as citocinas com expressão aumentada (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-4, IL-5 e IL-13) se interligaram fortemente com IL-9. E a IL-9, apresentou expressão forte no gráfico de rede se correlacionou com as ILs (IL-13, IL-10, IL-5, IL-4 e IL-6). No grupo controle negativo, a IL-9 também foi evidenciada através do gráfico de rede de correlações ( $\rho \geq 0,5$ ). A presença da IL-9 pode ter papel na modulação da imunidade das células Th1 e Th2, bem como na proteção e/ou patogênese de doenças virais, que ainda necessita de mais investigações (COLAVITA *et al.* 2018).

A presença de IL-4 e IL-13 produzidos por células Th2 e outros leucócitos, induzem macrófagos alternativamente ativados que atuam controlando a inflamação e promovendo reparo tecidual. Em nossos estudos assim como na pesquisa realizada por Naveca *et al* 2018, em que houveram dosagens de citocinas, em paciente com Zika vírus, a IL-4 foi encontrada em pacientes com infecção aguda do vírus e as IL-13 e IL-1 $\beta$  encontrados acompanhando a viremia, mas nesse mesmo estudo houve um aumento da IL-1ra.

A presença de IP-10 ( $p < 5,789 \times 10^{-7}$ ),  $p < 0,005$ , no controle positivo, ainda não se sabe ao certo se estar relacionada a replicação viral ou também participa da imunopatogênese da infecção pelo ZIKV. Assim, a IP-10 e a IL-5 estão fortemente associados ao exantema. (BARROS *et al.* 2018). A IP-10 (CXCL10) também tem sido fortemente implicado na patogênese da síndrome de Guillain-Barré (CHIANG; UBOGU, 2013), e pode contribuir para danos neuronais que afetam o cérebro fetal incluindo retardo de crescimento intrauterino e danos neurológicos induzidos por hipóxia, pré-eclâmpsia e hipertensão na gravidez, o que pode resultar em uma série de lesões fetais (GOTSCH *et al.* 2007).

A presença de proteína quimioatraente de monócitos-1 (MCP-1) em pacientes Zika positivos MCP-1 ( $p < 0,0433$ ) foi elevada em comparação aos controles negativos, está presente em toda a fase sintomática da doença, mas que foi encontrada em outras arboviroses com dengue e Chikungunya (SÁNCHEZ-ARCILA *et al.* 2020). As respostas Th1 e Th2 podem ser promovidas por MCP-1 regula a diferenciação de

monócitos em células dendríticas. A produção de IL-4 pelas células T é aumentada, pois a MCP-1 pode ativar o promotor de IL-4, o que resulta no aumento da resposta imune tipo 2 (SINGH; ANSHITA; RAVICHANDIRAN, 2021).

Outra fonte das interleucinas IL-4, IL-5 e IL-13 nos controles positivos e negativos que levam a uma resposta Th2 no exantema conforme já descrita por *EBEL et al. 2017*, pode ser através da ativação de ILC2s, que estão envolvidos no reparo tecidual, que leva à produção de grandes dessas citocinas.

## 9. CONCLUSÃO

- O Zika vírus ainda continua sendo uma das principais arboviroses causadora de doença em Manaus, conforme estatística da Fundação de Medicina Tropical Dr Heitor Vieira Dourado nos 3 últimos anos o vírus continua circulante.
- Das proteínas inflamatórias, biomarcadores inflamatórios positivos e negativos dosados, juntamente com análises de função hepática e renal e outros analitos adicionados no estudo, apenas a proteína C reativa com aumento inferior ao controle negativo pode ter sido ocasionado presença de IL-1ra nos controles positivos, que também apresentaram aumento no gama glutamil transferase ( $\gamma$ -gT). Em controles negativos, os biomarcadores inflamatórios positivos  $\alpha$ 1-glicoproteína ácida e proteína C reativa e nos testes de função hepática apenas a aspartato aminotransferase (TGO) a bilirrubina total e indireta, nos testes adicionais apenas o gama-glutamil transferase tiveram alterações discretas, contudo a proteína C reativa apresentou-se um aumento de 4 vezes o seu valor normal que pode ser devido ocasionada pela falta de IL-1ra tendo concentrações maiores de IL-1 e ainda a presença de IL-6. Os outros marcadores que tiveram uma discreta elevação, tem estudo escasso sobre essas alterações em pacientes exantemáticos Zika negativos.
- Nenhuma outra característica marcante que auxilie em um diagnóstico preciso para pacientes com Zika exantemático no caso de biomarcadores inflamatórios positivos e negativos foi encontrado, nem mesmo para auxiliar na diferenciação de diagnóstico com outras arboviroses.
- Das 26 citocinas e quimiocinas analisadas, podemos concluir que em pacientes Zika positivos exantemáticos a presença de IP-10 (CXCL-10) e IL-5 se fazem presentes nesta fase da doença.
- A presença de IL-12p40 e IL-15 presentes em nossos controles positivos, podem estar associados a infecção viral exantemática ao passo que os controles negativos não o fizeram presentes.
- Características comuns já relatadas a presença de IL-9, característica comuns as da arboviroses, que necessita de mais estudos como papel de modulador de células T.

## 10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1 ABBUL, K.A.; ANDREW, H.L; SHIV, P. Cellular and molecular immunology.ninth edition 9.Rio de Janeiro : Elsevier, 2019. Disponível em: <https://www.meulivro.biz/imunologia/2027/imunologia-celular-e-molecular-9-ed-pdf/> Acesso em: Abr.2020.

2 BARROS, Jéssica Barletto de Sousa; SILVA, Paulo Alex Neves da; KOGA, Rosemary de Carvalho Rocha; GONZALEZ-DIAS, Patrícia; CARMO FILHO, José Rodrigues; NAGIB, Patrícia Resende Alo; COELHO, Verônica; NAKAYA, Helder I.; FONSECA, Simone Gonçalves; PFRIMER, Irmtraut Araci Hoffmann. Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations. **Frontiers In Immunology**, [S.L.], v. 9, n. 1, p. 1-1, 3 maio 2018. Frontiers Media SA. <http://dx.doi.org/10.3389/fimmu.2018.00821>.

3 BARROS, J. B. de Sousa. Quantificação de moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias em indivíduos infectados pelo Zika vírus na fase aguda e convalescência.2017. 70f. **Dissertação** (Mestrado em ciências ambientais e saúde) Pontífice Universidade católica de Goiás, 2019.

4BAGHERIMOOGHADDAM, Ahmad; RAFATPANAH, Houshang; MANSOURITORGHABEH, Hassan. Elevated levels of C3 , C4 , and CH50 of the complement system in ICU and non-ICU patients with COVID -19. **Health Science Reports**, [S.L.], v. 5, n. 2, p. 1-6, 16 fev. 2022. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/hsr2.519>.

5 BARTHOLOMEU, Daniella Castanheira; GIUNCHETTI, Rodolfo Cordeiro; PESSOA, Grasielle Caldas D'ávila. The gut anti-complement activity of Aedes aegypti: investigating new ways to control the major human arboviruses vector in the americas. **Insect Biochemistry And Molecular Biology**, [S.L.], v. 120, p. 103338, maio 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.ibmb.2020.103338>

6 BOTTERMANN, Maria; FOSS, Stian; CADDY, Sarah L.; CLIFT, Dean; VAN TIENEN, Laurens M.; VAYSBURD, Marina; CRUICKSHANK, James; O'CONNELL, Kevin; CLARK, Jessica; MAYES, Keith. Complement C4 Prevents Viral Infection through Capsid Inactivation. **Cell Host & Microbe**, [S.L.], v. 25, n. 4, p. 617-629, abr. 2019. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.chom.2019.02.016>.

7 CABRAL, Virgínia Lúcia Ribeiro; CARVALHO, Luciana de; MISZPUTEN, Sender Jankiel. Importância da albumina sérica na avaliação nutricional e de atividade inflamatória em pacientes com doença de Crohn. **Arquivos de Gastroenterologia**, [S.L.], v. 38, n. 2, p. 104-108, abr. 2001. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0004-28032001000200005>.

8 CAMACHO-ZAVALA, Elizabeth; SANTACRUZ-TINOCO, Clara; MUÑOZ, Esteban; CHACÓN-SALINAS, Rommel; SALAZAR-SANCHEZ, Ma Isabel; GRAJALES, Concepción; GONZÁLEZ-IBARRA, Joaquin; BORJA-ABURTO, Victor Hugo; JAENISCH, Thomas; GONZALEZ-BONILLA, Cesar R.. Pregnant Women Infected with Zika Virus Show Higher Viral Load and Immunoregulatory Cytokines Profile with

CXCL10 Increase. **Viruses**, [S.L.], v. 13, n. 1, p. 80, 8 jan. 2021. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/v13010080>.

9 COLAVITA, Francesca; BORDONI, Veronica; CAGLIOTI, Claudia; BIAVA, Mirella; CASTILLETI, Concetta; BORDI, Licia; QUARTU, Serena; IANNETTA, Marco; IPPOLITO, Giuseppe; AGRATI, Chiara. ZIKV Infection Induces an Inflammatory Response but Fails to Activate Types I, II, and III IFN Response in Human PBMC. **Mediators Of Inflammation**, [S.L.], v. 2018, p. 1-6, 3 jun. 2018. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2018/2450540>.

10 CHEN, Charles B.; HAMMO, Bilasan; BARRY, Jessica; RADHAKRISHNAN, Kadakkal. Overview of Albumin Physiology and its Role in Pediatric Diseases. **Current Gastroenterology Reports**, [S.L.], v. 23, n. 8, p. 1-8, 2 jul. 2021. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s11894-021-00813-6>.

11 CHIANG, Sharon; UBOGU, Eroboghene E.. The role of chemokines in guillain-barré syndrome. **Muscle & Nerve**, [S.L.], v. 48, n. 3, p. 320-330, 27 jul. 2013. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/mus.23829>.

12 DRAGO, Francesco; CICCARESE, Giulia; GASPARINI, Giulia; COGORNIO, Ludovica; JAVOR, Sanja; TONIOLO, Antonio; BROCCOLO, Francesco. Contemporary infectious exanthems: an update. **Future Microbiology**, [S.L.], v. 12, n. 2, p. 171-193, fev. 2017. Future Medicine Ltd. <http://dx.doi.org/10.2217/fmb-2016-0147>.

13 DEPALMA, Ralph G; HAYES, Virginia W; O'LEARY, Timothy J. Optimal serum ferritin level range: iron status measure and inflammatory biomarker. **Metallomics**, [S.L.], v. 13, n. 6, p. 01-32, 28 maio 2021. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/mtomcs/mfab030>

14 EBERL, Gérard; COLONNA, Marco; SANTO, James P. di; MCKENZIE, Andrew N. J.. Innate lymphoid cells: a new paradigm in immunology. **Science**, [S.L.], v. 348, n. 6237, p. 1-1, 22 maio 2015. American Association for the Advancement of Science (AAAS). <http://dx.doi.org/10.1126/science.aaa6566>.

15 EHLTING, Christian; WOLF, Stephanie D.; BODE, Johannes G.. Acute-phase protein synthesis: a key feature of innate immune functions of the liver. **Biological Chemistry**, [S.L.], v. 402, n. 9, p. 1129-1145, 29 jul. 2021. Walter de Gruyter GmbH. <http://dx.doi.org/10.1515/hsz-2021-0209>.

16 FIGUEIREDO, Regina Maria Pinto de; THATCHER, Bedsy Dutary; LIMA, Mário Lira de; ALMEIDA, Tânia Carvalho; ALECRIM, Wilson Duarte; GUERRA, Marcus Vinitius de Farias. Doenças exantemáticas e primeira epidemia de dengue ocorrida em Manaus, Amazonas, no período de 1998-1999. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, S.L, v. 37, n. 6, p. 476-479, dez. 2004. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/s0037-86822004000600009>

17 FIGUEIREDO, Maria Stella. Impacto da inflamação na regulação do ferro e deficiência funcional de ferro. **Revista Brasileira de Hematologia e Hemoterapia**, [S.L.], v. 32, p. 18-21, jun. 2010. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1590/s1516-84842010005000052>.



18 GABAY, Cem; KUSHNER, Irving. Acute-Phase Proteins and Other Systemic Responses to Inflammation. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 340, n. 6, p. 448-454, 11 fev. 1999. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejm199902113400607>.

19 GIOVANETTI, Marta; PEREIRA, Luiz Augusto; ADELINO, Talita Émile Ribeiro; FONSECA, Vagner; XAVIER, Joilson; FABRI, Allison de Araújo; SLAVOV, Svetoslav Nanev; LEMOS, Poliana da Silva; MARQUES, William de Almeida; KASHIMA, Simone. A Retrospective Overview of Zika Virus Evolution in the Midwest of Brazil. **Microbiology Spectrum**, [S.L.], v. 10, n. 2, p. 1-1, 27 abr. 2022. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/spectrum.00155-22>.

20 GOTSCH, Francesca; ROMERO, Roberto; FRIEL, Lara; KUSANOVIC, Juan Pedro; ESPINOZA, Jimmy; EREZ, Offer; THAN, Nandor Gabor; MITTAL, Pooja; EDWIN, Samuel; YOON, Bo Hyun. CXCL10/IP-10: a missing link between inflammation and anti-angiogenesis in preeclampsia?. **The Journal Of Maternal-Fetal & Neonatal Medicine**, [S.L.], v. 20, n. 11, p. 777-792, jan. 2007. Informa UK Limited. <http://dx.doi.org/10.1080/14767050701483298>.

21 GUBLER, Duane J.. Dengue and Dengue Hemorrhagic Fever. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 11, n. 3, p. 480-496, jul. 1998. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.11.3.480>.

22 HAMEL, Rodolphe; DEJARNAC, Ophélie; WICHIT, Sineewanlaya; EKCHARIYAWAT, Peeraya; NEYRET, Aymeric; LUPLERTLOP, Natthanej; PERERALECOIN, Manuel; SURASOMBATPATTANA, Pornapat; TALIGNANI, Loïc; THOMAS, Frédéric. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. **Journal Of Virology**, [S.L.], v. 89, n. 17, p. 8880-8896, set. 2015. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/jvi.00354-15>.

23 HERNÁNDEZ, Rosa Méndez; RUEDA, Fernando Ramasco. Biomarkers as Prognostic Predictors and Therapeutic Guide in Critically Ill Patients: clinical evidence. **Journal Of Personalized Medicine**, [S.L.], v. 13, n. 2, p. 625-627, 15 fev. 2023. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/jpm13020333>.

24 JAYE, David L.; WAITES, Ken B.. Clinical applications of C-reactive protein in pediatrics. **The Pediatric Infectious Disease Journal**, [S.L.], v. 16, n. 8, p. 735-747, ago. 1997. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.1097/00006454-199708000-00003>.

25 JAVED, Farakh; MANZOOR, Khanzadi N.; ALI, Mubashar; HAQ, Irshad U.; KHAN, Abid A.; ZAIB, Assad; MANZOOR, Sobia. Zika virus: what we need to know?. **Journal Of Basic Microbiology**, [S.L.], v. 58, n. 1, p. 3-16, 13 nov. 2017. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1002/jobm.201700398>.

26 KABATA, Hiroki; MORO, Kazuyo; KOYASU, Shigeo. The group 2 innate lymphoid cell (ILC2) regulatory network and its underlying mechanisms. **Immunological Reviews**, [S.L.], v. 286, n. 1, p. 37-52, 7 out. 2018. Wiley. <http://dx.doi.org/10.1111/imr.12706>.

27 KALANTAR-ZADEH, Kamyar; KALANTAR-ZADEH, Kourosh; LEE, Grace H.. The Fascinating but Deceptive Ferritin. **Clinical Journal Of The American Society Of**

**Nephrology**, [S.L.], v. 1, n. 1, p. 9-18, set. 2006. Ovid Technologies (Wolters Kluwer Health). <http://dx.doi.org/10.2215/cjn.01390406>.

28 KINDHAUSER, Mary Kay; ALLEN, Tomas; FRANK, Veronika; SANTHANA, Ravi Shankar; DYE, Christopher. Zika: the origin and spread of a mosquito-borne virus. **Bulletin Of The World Health Organization**, [S.L.], v. 94, n. 9, p. 675-686, 9 fev. 2016. WHO Press. <http://dx.doi.org/10.2471/blt.16.171082>.

29 KONO, Satoshi. Aceruloplasminemia. **Current Drug Targets**, [S.L.], v. 13, n. 9, p. 1190-1199, 1 jul. 2012. Bentham Science Publishers Ltd.. <http://dx.doi.org/10.2174/138945012802002320>.

30 KORMAN, Abraham M.; ALIKHAN, Ali; KAFFENBERGER, Benjamin H.. Viral exanthems: an update on laboratory testing of the adult patient. **Journal Of The American Academy Of Dermatology**, [S.L.], v. 76, n. 3, p. 538-550, mar. 2017. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2016.08.034>.

31 KUHN, Richard J.; ZHANG, Wei; ROSSMANN, Michael G.; PLETNEV, Sergei V.; CORVER, Jeroen; LENCHES, Edith; JONES, Christopher T.; MUKHOPADHYAY, Suchetana; CHIPMAN, Paul R.; STRAUSS, Ellen G.. Structure of Dengue Virus. **Cell**, S.L., v. 108, n. 5, p. 717-725, mar. 2002. Elsevier BV. [http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674\(02\)00660-8](http://dx.doi.org/10.1016/s0092-8674(02)00660-8).

32 ISA, Hasan M.; MOHROOFI, Abdulrahman D.; ALKHAN, Fatema N.; HASAN, Asma Z.; ALKUBISI, Mariam M.; ALHEWAIZEM, Sana S.; KHALIFA, Sara I.; ALROMAIHI, Noora G.. C-Reactive Protein Levels in Children with Acute Bronchiolitis. **International Journal Of Pediatrics**, [S.L.], v. 2022, p. 1-7, 23 maio 2022. Hindawi Limited. <http://dx.doi.org/10.1155/2022/1311936>.

33 LEVINSON, Tal; WASSERMAN, Asaf. C-Reactive Protein Velocity (CRPv) as a New Biomarker for the Early Detection of Acute Infection/Inflammation. **International Journal Of Molecular Sciences**, [S.L.], v. 23, n. 15, p. 2-10, 22 jul. 2022. MDPI AG. <http://dx.doi.org/10.3390/ijms23158100>

34 LOPEZ, Joseph. Carl A. Burtis, Edward R. Ashwood and David E. Bruns (eds): tietz textbook of clinical chemistry and molecular diagnosis (5th edition). **Indian Journal Of Clinical Biochemistry**, S.L., v. 28, n. 1, p. 104-105, 13 dez. 2012. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s12291-012-0287-7>.

35 LÖWEN, Levy Chalhoub, F.; Maia de Queiroz-Júnior, E.; Holanda Duarte, B.; Eielson Pinheiro de Sá, M.; Cerqueira Lima, P.; Carneiro de Oliveira, A.; Medeiros Neves Casseb, L.; Leal das Chagas, L.; Antônio de Oliveira Monteiro, H.; Sebastião Alberto Santos Neves, M.; et al. West Nile Virus in the State of Ceará, NortheastBrazil. **Microorganisms** **2021**, 9,1699.<https://doi.org/10.3390/microorganism9081699>

36 MACIEL, Luiz Henrique Gonçalves; ROCHA NETO, Cosmo Vieira da; MARTINS, Yasmin Ferreira; FURTADO, Francielen de Azevedo; TEIXEIRA, Pâmela Cunha; DIAS, Maianne Yasmin Oliveira; RODRIGUES, Yanka Karolinn Batista; PIAUILINO, Isa Cristina Ribeiro; PINTO, Sérgio Damasceno; ALENCAR, Aline Cristiane Côrte. Prevalence of arboviruses and other infectious causes of skin rash in patients treated

at a tertiary health unit in the Brazilian Amazon. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 16, n. 10, p. 1-18, 13 out. 2022. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0010727>.

37 MAUCOURANT, Christopher; QUEIROZ, Gabriel Andrade Nonato; CORNEAU, Aurelien; GOIS, Luana Leandro; MEGHRAOUI-KHEDDAR, Aida; TARANTINO, Nadine; BANDEIRA, Antonio Carlos; SAMRI, Assia; BLANC, Catherine; YSSEL, Hans. NK Cell Responses in Zika Virus Infection Are Biased towards Cytokine-Mediated Effector Functions. **The Journal Of Immunology**, [S.L.], v. 207, n. 5, p. 1333-1343, 1 set. 2021. The American Association of Immunologists. <http://dx.doi.org/10.4049/jimmunol.2001180>.

38 MAUCOURANT, Christophe; QUEIROZ, Gabriel Andrade Nonato; GRASSI, Assia Samri, Maria Fernanda Rios; YSSEL, Hans; VIEILLARD, Vincent Zika vírus no olho da tempestade de citocinas. **Rede Europeia de Citocinas**. 2019;30(3):74-81. doi:10.1684/ecn.2019.0433

39 MAGALHAES, Tereza; BRAGA, Cynthia; CORDEIRO, Marli T.; OLIVEIRA, Andre L. S.; CASTANHA, Priscila M. S.; MACIEL, Ana Paula R.; AMANCIO, Nathalia M. L.; GOUVEIA, Pollyanne N.; PEIXOTO-DA-SILVA, Valter J.; PEIXOTO, Thaciana F. L.. Zika virus displacement by a chikungunya outbreak in Recife, Brazil. **Plos Neglected Tropical Diseases**, [S.L.], v. 11, n. 11, p. 1-33, 6 nov. 2017. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pntd.0006055>

40 MANTOVANI, Alberto; GARLANDA, Cecilia. Humoral Innate Immunity and Acute-Phase Proteins. **New England Journal Of Medicine**, [S.L.], v. 388, n. 5, p. 439-452, 2 fev. 2023. Massachusetts Medical Society. <http://dx.doi.org/10.1056/nejmra2206346>.

41 MAICÁ, Anahi Ottonelli; SCHWEIGERT, Ingrid Dalira. Avaliação nutricional em pacientes graves. **Revista Brasileira de Terapia Intensiva**, [S.L.], v. 20, n. 3, p. 286-295, set. 2008. GN1 Genesis Network. <http://dx.doi.org/10.1590/s0103-507x2008000300012.4>

42 MS- Ministério da saúde do Brasil. Disponível em: <https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no48/view>

43 MASI, Alessandra di; SIMONE, Giovanna de; CIACCIO, Chiara; D'ORSO, Silvia; COLETTA, Massimo; ASCENZI, Paolo. Haptoglobin: from hemoglobin scavenging to human health. **Molecular Aspects Of Medicine**, [S.L.], v. 73, n. 1, p. 100851-100852, jun. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.mam.2020.100851>.

44 MUSSO, Didier; GUBLER, Duane J.. Zika Virus. **Clinical Microbiology Reviews**, [S.L.], v. 29, n. 3, p. 487-524, jul. 2016. American Society for Microbiology. <http://dx.doi.org/10.1128/cmr.00072-1536>

45 NAVECA, Felipe Gomes; PONTES, Gemilson Soares; CHANG, Aileen Yu-Hen; SILVA, George Allan Villarouco da; NASCIMENTO, Valdinete Alves do; MONTEIRO, Dana Cristina da Silva; SILVA, Marineide Souza da; ABDALLA, Lígia Fernandes; SANTOS, João Hugo Abdalla; ALMEIDA, Tatiana Amaral Pires de. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, [S.L.], v. 113, n. 6, p. 1-35, 14 maio 2018. FapUNIFESP (SciELO). <http://dx.doi.org/10.1590/0074-02760170542>.

46 OLAGNIER, David; MUSCOLINI, Michela; COYNE, Carolyn B.; DIAMOND, Michael S.; HISCOTT, John. Mechanisms of Zika Virus Infection and Neuropathogenesis. **Dna And Cell Biology**, [S.L.], v. 35, n. 8, p. 367-372, ago. 2016. Mary Ann Liebert Inc. <http://dx.doi.org/10.1089/dna.2016.3404>.

47 PEREIRA-FILHO, Adalberto Alves; PEREIRA, Rafael Henrique Mateus; SILVA, Naylene Carvalho Sales da; MALTA, Luccas Gabriel Ferreira; SERRAVITE, Artur Metzker; ALMEIDA, Caio Gabriel Carvalho de; FUJIWARA, Ricardo Toshio; 47

48 PÊSSOA, R. Alves: avaliação do perfil de resposta imunológica celular em pacientes durante a infecção aguda pelo vírus Zika. 2019. 72f. **Dissertação** (Mestrado em Ciências Biológicas) centro de Biociências departamento de microbiologia e parasitologia da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2019.

49 PIELNAA, Paul; AL-SAADAWA, Moyed; SARO, Adonira; DAMA, Marcellin Faniriantsoahenrio; ZHOU, Mei; HUANG, Yanxia; HUANG, Jufang; XIA, Zanzian. Zika virus-spread, epidemiology, genome, transmission cycle, clinical manifestation, associated challenges, vaccine and antiviral drug development. **Virology**, [S.L.], v. 543, p. 34-42, abr. 2020. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.virol.2020.01.015>.

50 ROSA NETO, Nilton Salles; CARVALHO, Jozélio Freire de. O uso de provas de atividade inflamatória em reumatologia. **Revista Brasileira de Reumatologia**, [S.L.], v. 49, n. 4, p. 413-430, ago. 2009. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1590/s0482-50042009000400008>.

51 ŞAYLđK, Faysal; ÇđNAR, Tufan; SELÇUK, Murat; TANBOđA, İbrahim Halil. A Relação entre a Relação Ácido Úrico/Albumina e a Espessura Média-Intimal da Carótida em Pacientes com Hipertensão. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, [S.L.], v. 120, n. 5, p. 1-9, 10 abr. 2023. Sociedade Brasileira de Cardiologia. <http://dx.doi.org/10.36660/abc.20220819>.

52 SÁNCHEZ-ARCILA, Juan Camilo; BADOLATO-CORREA, Jessica; SOUZA, Thiara Manuele Alves de; PAIVA, Iury Amâncio; BARBOSA, Luciana Santos; NUNES, Priscila Conrado Guerra; LIMA, Monique da Rocha Queiroz; SANTOS, Flavia Barrento dos; DAMASCO, Paulo Vieira; CUNHA, Rivaldo Venancio da. Clinical, Virological, and Immunological Profiles of DENV, ZIKV, and/or CHIKV-Infected Brazilian Patients. **Intervirology**, [S.L.], v. 63, n. 1-6, p. 33-45, 2020. S. Karger AG. <http://dx.doi.org/10.1159/000510223>.

53 SHAN, Chao; XIE, Xuping; LUO, Huanle; MURUATO, Antonio E.; LIU, Yang; WAKAMIYA, Maki; LA, Jun-Ho; CHUNG, Jin Mo; WEAVER, Scott C.; WANG, Tian. Maternal vaccination and protective immunity against Zika virus vertical transmission. **Nature Communications**, [S.L.], v. 10, n. 1, p. 1-12, 12 dez. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-019-13589-1>.

54 SILVA, Marcelo Henrique Matias da; MOISES, Raiza Nara Cunha; ALVES, Brenda Elen Bizerra; PEREIRA, Hannaly Wana Bezerra; PAIVA, Anne Aline Pereira de; MORAIS, Ingryd Câmara; NASCIMENTO, Yasmim Mesquita; MONTEIRO, Joelma Dantas; SOUTO, Janeusa Trindade de; NASCIMENTO, Manuela Sales Lima. Innate immune response in patients with acute Zika virus infection. **Medical Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 208, n. 6, p. 703-714, 16 mar. 2019. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-019-00588-8>.

55 SILVA, Elisandro da. ZIKA VÍRUS: FATORES EVOLUTIVOS DETERMINANTES PARA SUA EPIDEMIA E PATOGENIA. **Saúde Integrada**, [s. l.], p. 51-59, 2017.

56 SINAN – SISTEMA DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS E NOTIFICAÇÕES. Disponível em: [https://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg\\_2020/Doencas\\_e\\_Agravoslist.asp](https://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2020/Doencas_e_Agravoslist.asp). Acesso em 10/07/2023.

57 SINAN – SISTEMA DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS E NOTIFICAÇÕES. 56 Disponível em: [https://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg\\_2021/Doencas\\_e\\_Agravoslist.asp](https://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2021/Doencas_e_Agravoslist.asp). Acesso em 10/07/2023.

58 SINAN – SISTEMA DE NOTIFICAÇÃO DE AGRAVOS E NOTIFICAÇÕES. Disponível em: [https://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg\\_2022/Doencas\\_e\\_Agravoslist.asp](https://www.fmt.am.gov.br/layout2011/vigiweb/vg_2022/Doencas_e_Agravoslist.asp). Acesso em 10/07/2023.

59 SINGH, Sanjiv; ANSHITA, D.; RAVICHANDIRAN, V.. MCP-1: function, regulation, and involvement in disease. **International Immunopharmacology**, [S.L.], v. 101, p. 107598, dez. 2021. Elsevier BV. <http://dx.doi.org/10.1016/j.intimp.2021.107598>

60 SIROHI, Devika; KUHN, Richard J. Zika Virus Structure, Maturation, and Receptors. **The Journal Of Infectious Diseases**, [S.L.], v. 216, n. 10, p. 935-944, 15 dez. 2017. Oxford University Press (OUP). <http://dx.doi.org/10.1093/infdis/jix515>.

61 SUN, Xiaoming; HUA, Stephane; GAO, Ce; BLACKMER, Jane E.; OUYANG, Zhengyu; ARD, Kevin; CIARANELLO, Andrea; YAWETZ, Sigal; SAX, Paul E.; ROSENBERG, Eric S.. Immune-profiling of ZIKV-infected patients identifies a distinct function of plasmacytoid dendritic cells for immune cross-regulation. **Nature Communications**, [S.L.], v. 11, n. 1, p. 1-13, 15 maio 2020. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41467-020-16217-5>.

62 TAPPE, Dennis; PÉREZ-GIRÓN, José Vicente; ZAMMARCHI, Lorenzo; RISSLAND, Jürgen; FERREIRA, Davis F.; JAENISCH, Thomas; GÓMEZ-MEDINA, Sergio; GÜNTHER, Stephan; BARTOLONI, Alessandro; MUÑOZ-FONTELA, César. Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to reconvalescent phase. **Medical Microbiology And Immunology**, [S.L.], v. 205, n. 3, p. 269-273, 24 dez. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00430-015-0445-7>.

63 TOGNARELLI, J.; ULLOA, S.; VILLAGRA, E.; LAGOS, J.; AGUAYO, C.; FASCE, R.; PARRA, B.; MORA, J.; BECERRA, N.; LAGOS, N.. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. **Archives Of Virology**, [S.L.], v. 161, n. 3, p. 665-668, 26 nov. 2015. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1007/s00705-015-2695-5>.

64 YANG, Xiaobo; SUN, Jielin; GAO, Yong; TAN, Aihua; ZHANG, Haiying; HU, Yanling; FENG, Junjie; QIN, Xue; TAO, Sha; CHEN, Zhuo. Genome-Wide Association Study for Serum Complement C3 and C4 Levels in Healthy Chinese Subjects. **Plos Genetics**, [S.L.], v. 8, n. 9, p. 1-8, 13 set. 2012. Public Library of Science (PLoS). <http://dx.doi.org/10.1371/journal.pgen.1002916>

65 WU, Yanhua; CUI, Xiaoyun; WU, Na; SONG, Rui; YANG, Wei; ZHANG, Wei; FAN, Dongying; CHEN, Zhihai; AN, Jing. A unique case of human Zika virus infection in association with severe liver injury and coagulation disorders. **Scientific Reports**, [S.L.], v. 7, n. 1, p. 1-1, 12 set. 2017. Springer Science and Business Media LLC. <http://dx.doi.org/10.1038/s41598-017-11568-4>.

## 11 APÊNDICES

### 11.1 Valores das dosagens de citocinas e quimiocinas

Tabela 4. Níveis de citocinas e quimiocinas pró-inflamatórias e anti-inflamatórias.

	Zika positive (n)	Mean $\pm$ SEM	Zika Negative (n)	Mean $\pm$ SEM	p-value	AIC
Eotaxin	61	4.715 $\pm$ 0.04	43	4.690 $\pm$ 0.04	0.9255	33.43
TGF- $\alpha$	14	1.390 $\pm$ 0.62	15	2.719 $\pm$ 0.23	0.2162	115.5
G-CSF	46	4.834 $\pm$ 0.09	31	5.046 $\pm$ 0.10	0.0563	137.8
GM-CSF	62	3.398 $\pm$ 0.09	44	3.361 $\pm$ 0.13	0.6513	248.5
Fractalkine	52	3.210 $\pm$ 0.09	31	3.212 $\pm$ 0.11	0.8843	154.1
IFN- $\alpha$ 2	60	4.859 $\pm$ 0.08	38	5.022 $\pm$ 0.10	0.1600	182.5
IFN- $\gamma$	56	3.080 $\pm$ 0.13	33	3.303 $\pm$ 0.21	0.4119	269.2
IL-10	53	3.951 $\pm$ 0.14	29	3.918 $\pm$ 0.17	0.3758	234.3
IL-12p40	25	0.998 $\pm$ 0.30	18	1.367 $\pm$ 0.25	0.3135	153.1
IL-12p70	51	1.031 $\pm$ 0.14	33	1.233 $\pm$ 0.20	0.3872	256.2
IL-13	11	5.308 $\pm$ 0.28	9	4.931 $\pm$ 0.33	0.3801	61.11
IL-15	49	0.496 $\pm$ 0.20	25	0.929 $\pm$ 0.27	0.2492	265.8
IL-17A	47	1.174 $\pm$ 0.19	33	1.447 $\pm$ 0.20	0.3122	265.5
IL-1RA	62	5.299 $\pm$ 0.09	43	4.836 $\pm$ 0.14	<b>0.01355</b>	257.6
IL-9	11	5.075 $\pm$ 0.33	12	4.024 $\pm$ 0.42	0.06934	83.16
IL-1 $\beta$	42	1.680 $\pm$ 0.14	25	1.873 $\pm$ 0.17	0.4829	183.4
IL-4	9	7.082 $\pm$ 0.50	8	6.005 $\pm$ 0.66	0.2239	71.11
IL-5	14	3.331 $\pm$ 0.27	15	2.724 $\pm$ 0.30	0.187	93.21
IL-6	12	4.578 $\pm$ 0.34	12	4.487 $\pm$ 0.25	0.7998	74.06
IL-8	8	4.622 $\pm$ 0.32	12	3.261 $\pm$ 0.37	<b>0.02252</b>	68.38
IP-10	61	8.963 $\pm$ 0.04	44	8.140 $\pm$ 0.15	<b>5.789e-07</b>	231.5
MCP-1	62	6.520 $\pm$ 0.07	43	6.236 $\pm$ 0.09	<b>0.0433</b>	178
MIP1- $\alpha$	14	3.197 $\pm$ 0.23	11	2.388 $\pm$ 0.38	0.06844	80.07
MIP1- $\beta$	61	5.112 $\pm$ 0.03	43	5.056 $\pm$ 0.04	0.3494	16.35
TNF- $\alpha$	61	4.239 $\pm$ 0.03	44	4.187 $\pm$ 0.06	0.5117	68.86
VEGF	32	4.084 $\pm$ 0.15	25	3.770 $\pm$ 0.27	0.1615	176.7

## 11.2 Valores de referências e metodologias.

Quadro 3. Metodologias e valores de referência dos testes comerciais utilizados para as análises de biomarcadores de proteínas pró-inflamatórias e funções hepática e renal.

TESTE	VR	VR	SEXO	UNID	FABRICANTE		ENSAIO
<b>Alfa1 glicoproteína Ácida</b>	50	130	Homens	mg/dL	kovalente		Turbidimétrico
	40	120	mulher	mg/dL			Imunoturbidimetria
<b>Haptoglobina</b>	32	205		mg/dL	APTEC		Imunoturbidimetria
<b>Transferrina</b>	170	340		mg/dL	kovalente		Turbidimétrico
<b>Ceruloplasmina</b>	22	61		mg/dL	APTEC		Imunoturbidimetria
<b>C3</b>	75	175		mg/dL	kovalente		Turbidimétrico
<b>C4</b>	0,9	36		mg/dL	kovalente		Turbidimétrico
<b>IgM</b>	22	240	Homens	mg/dL	ABBOTT		Imunoturbidimetria
	33	293	mulher	mg/dL	ABBOTT		
<b>PCR</b>	≤ 0,5			mg/dL	ABBOTT		Turbidimetria
<b>LDH</b>	< 480			U/L	kovalente	Temp 37C	DGKC
<b>Albumina</b>	3,5	5		g/dL	ABBOTT	Adultos	colorimétrico - bromo-cresol
<b>FERRITINA</b>	21,81	274,66	Homens	ng/mL	ABBOTT		Quimioluminescência
	4,63	204	mulher	ng/mL	ABBOTT		
<b>GGT</b>	< 38			mg/dL	kovalente		cinética-colorimétrica
<b>ALT</b>	0,0	55		U/L	ABBOTT		NADH
<b>AST</b>	5	34		U/L	ABBOTT		
<b>BT</b>	0,2	1,2		mg/dL	ABBOTT		
<b>BD</b>	0,0	0,5		mg/dL	ABBOTT		Reação de Diazo
<b>BI</b>							
<b>UREIA</b>	19	44	Homens		ABBOTT		Urease
	14,98	40	mulher		ABBOTT		
<b>CREATININA</b>	0,7	1,3	Homens	mg/dL	ABBOTT		Jaffe
	0,6	1,2	mulher	mg/dL			



### 11.3 Gráfico comparativo de todas as 26 citocinas.



Figura 9 B. Os gráficos mostram a mediana, quartil superior e inferior, valores mínimos e máximos para controles positivos versus controles negativos (teste de Mann-Whitney). Os valores de  $P < 0,05$  são considerados significantes.

## ANEXO

## 12.1 Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DA EMENDA**

**Título da Pesquisa:** PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS EM PACIENTES COM DOENÇA EXANTEMÁTICA AGUDA ATENDIDOS EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA DE SAÚDE EM MANAUS - AMAZONAS

**Pesquisador:** Camilla Helena Aguiar Bótto de Menezes

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 80961517.6.0000.0005

**Instituição Proponente:** Fundação de Medicina Tropical do Amazonas - FMT/IMT/AM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 2.611.564

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se da apreciação de uma EMENDA do Estudo (já aprovado) intitulado PREVALÊNCIA DE INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS EM PACIENTES COM DOENÇA EXANTEMÁTICA AGUDA ATENDIDOS EM UMA UNIDADE TERCIÁRIA DE SAÚDE EM MANAUS - AMAZONAS da pesquisadora Camilla Helena Aguiar Bótto de Menezes. Este é uma vertente do estudo de coorte "Persistência do vírus Zika nos fluidos corporais de pacientes com infecção pelo vírus Zika – ZIKABRA", em andamento desde julho de 2017 na FMT-HVD. O diagnóstico de infecção pelos vírus Zika, Mayaro e Oropuche será feito por técnicas de biologia molecular na gerência de virologia da FMT-HVD. Faz

se necessária a confirmação de infecção por esses vírus, haja vista que a comprovação de circulação desse grupo de doenças virais responsáveis por surtos principalmente nos períodos de maior pluviosidade

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Estimar a prevalência de infecção por arbovírus em pacientes com doença exantemática aguda atendidos em uma unidade terciária de saúde em Manaus, Amazonas.

**Objetivo Secundário:**

- Estimar a prevalência de infecção pelos arbovírus Zika, Mayaro e Oropuche;
- Descrever o perfil epidemiológico da população atendida;

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.611.564

-Descrever as características clínicas e laboratoriais e suas possíveis relações com as infecções pelos arbovirus.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Riscos:**

O risco principal que identificamos na nossa pesquisa é o possível vazamento de informações que você deu aos profissionais de saúde que lhe atenderam. Para evitar que isto aconteça, este documento que agora você está lendo chamado de TCLE e que constam dados que o(a) identificam como seu nome, será mantido pela pesquisadora principal em local seguro, sob chave e não será guardado junto com outras fichas do seu atendimento. A ficha será identificada com um número que não permitirá fazer associação com sua pessoa. Para evitar o risco de acontecer algum evento indesejável durante a coleta de sangue, como a formação da mancha roxa dolorosa ou infecção, a coleta será feita e por um profissional treinado e experiente que utilizará material estéril (que só será usado uma única vez)

**Benefícios:**

Além de saber se você está ou não com infecção por um desses virus já mencionados, ao participar deste estudo, você também estará contribuindo com informações futuras sobre essas doenças. É importante citar que você não receberá qualquer benefício adicional, nem ganhará dinheiro por participar do estudo

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante e a pesquisadora anexou todos os documentos necessários e realizou as adequações solicitadas na metodologia

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

**DOCUMENTOS ANEXADOS A ESTE PROTOCOLO**

- 1-Projeto da PB
- 2-Projeto detalhado
- 3-TCLE
- 4-FOLHA DE ROSTO
- 5-FOLHA RESPOSTA
- 6-ANUENCIA DA DAM
- 7-PLANILHA COM O CRONOGRAMA
- 8-ANUENCIA DA VIROLOGIA

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (92)2127-3572 Fax: (92)2127-3572 E-mail: csp@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.611.964

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

Justificativa da Emenda:

A justificativa para a solicitação de emenda é devido a inclusão da investigação de outras infecções (Zika, DENGUE, CHYUNGUNEA, Mayaro ou Oropouche, Parvovirus B19, EPSTEIN-BARR, CITOMEGALOVIRUS, SARAMPO, rubéola e HIV, Infecção bacteriana por SIFILES) que cursam com doença exantemática aguda para o diagnóstico diferencial das síndromes exantemáticas em adultos. Este objetivo foi incluído somente agora, pois o estudo por meio de parcerias realizadas com projetos em andamento na Gerência de Virologia na FMT-HVD, conseguirá realizar os testes incluídos na nova versão. Ambos o protocolo e TCLE alterados foram anexados.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O presente projeto está APROVADO e os Interessados ficam Informados de apresentar a este CEP os relatórios, parciais e o final, do estudo conforme prevê a Resolução CNS nº 466/2012, utilizando o formulário de Roteiro para Relatório Parcial/Final de estudos clínicos Unicêntricos e Multicêntricos, proposto pela CONEP em nossa home page.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_109998_2_E1.pdf	26/03/2018 12:34:03		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Brochura_infec_arbo_220318_alteracoes_aceltas.pdf	26/03/2018 12:30:24	Camila Helena Agular Bótto de Menezes	Aceito
Brochura Pesquisa	Brochura_220318_alteracoes_realcadas.docx	23/03/2018 11:07:43	Camila Helena Agular Bótto de Menezes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v180318_alteracoes_realcadas.doc	23/03/2018 11:00:44	Camila Helena Agular Bótto de Menezes	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_v180318_alteracoes_aceltas.doc	23/03/2018 11:00:30	Camila Helena Agular Bótto de Menezes	Aceito
Outros	FolhaResposta.pdf	19/01/2018 00:33:38	LUIZ HENRIQUE GONÇALVES MACIEL	Aceito

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (02)2127-3572 Fax: (02)2127-3572 E-mail: cep@fnt.am.gov.br

FUNDAÇÃO DE MEDICINA  
TROPICAL "DOUTOR HEITOR  
VIEIRA DOURADO"



Continuação do Parecer: 2.011.864

Outros	AnuenciaDAM.pdf	19/01/2018 00:27:26	LUIZ HENRIQUE GONÇALVES MACIEL	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Termo_Anuencia_Virol.pdf	08/12/2017 22:49:01	Camila Helena Aguilar Bóto de Menezes	Aceito
Orçamento	Orcamento.pdf	08/12/2017 22:26:49	Camila Helena Aguilar Bóto de Menezes	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	08/12/2017 22:26:27	Camila Helena Aguilar Bóto de Menezes	Aceito
Folha de Rosto	Folha_Rosto.pdf	08/12/2017 14:03:35	LUIZ HENRIQUE GONÇALVES MACIEL	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 20 de Abril de 2018

Assinado por:  
Marilaine Martins  
(Coordenador)

Endereço: Av. Pedro Teixeira, 25  
Bairro: D. Pedro I CEP: 69.040-000  
UF: AM Município: MANAUS  
Telefone: (02)2127-3572 Fax: (02)2127-3572 E-mail: cep@fml.am.gov.br