

MINISTÉRIO DA SAÚDE
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ
INSTITUTO OSWALDO CRUZ

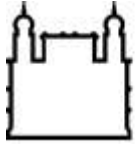
Mestrado no Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, EPIDEMIOLÓGICAS E PERFIL DE CITOCINAS
EM PACIENTES NATURALMENTE INFECTADOS PELO DENGUE, ZIKA OU
COINFECTADOS DURANTE A EPIDEMIA DE 2016,
MATO GROSSO DO SUL, BRASIL.

LUCIANA SANTOS BARBOSA

Rio de Janeiro

Junho 2018



Ministério da Saúde

FIOCRUZ

Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LUCIANA SANTOS BARBOSA

Características clínicas, epidemiológicas e perfil de citocinas em pacientes naturalmente infectados pelo dengue, zika ou coinfectados durante a epidemia de 2016, Mato Grosso do Sul, Brasil.

Dissertação apresentada ao Instituto Oswaldo Cruz como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Ciências na área de Doenças Infecciosas e Parasitárias

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Elzinandes Leal de Azeredo

Rio de Janeiro

Junho de 2018

Barbosa, Luciana Santos.

Características clínicas, epidemiológicas e perfil de citocinas em pacientes naturalmente infectados pelo dengue, zika ou coinfectedos durante a epidemia de 2016, Mato Grosso do Sul, Brasil. / Luciana Santos Barbosa. - Rio de Janeiro, 2018.

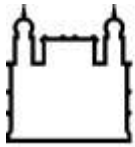
112 f.; il.

Dissertação (Mestrado) - Instituto Oswaldo Cruz, Pós-Graduação em Medicina Tropical, 2018.

Orientadora: Elzinandes Leal de Azeredo.

Bibliografia: f. 84-102

1. Vírus dengue. 2. Vírus Zika. 3. Coinfecção dengue e Zika. 4. Citocinas.
I. Título.



Ministério da Saúde

FIOCRUZ
Fundação Oswaldo Cruz

INSTITUTO OSWALDO CRUZ

Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical

LUCIANA SANTOS BARBOSA

Características clínicas, epidemiológicas e perfil de citocinas em pacientes naturalmente infectados pelo dengue, Zika ou coinfectados durante a epidemia de 2016, Mato Grosso do Sul, Brasil.

ORIENTADORA: Prof^a. Dr^a. Elzinandes Leal de Azeredo

Aprovada em: 20/06/2018

EXAMINADORES:

Prof^a. Dr^a. Roberta Olmo Pinheiro (IOC/FIOCRUZ) - Presidente

Prof^a. Dr^a. Adriana Lima Vallochi (IOC/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Sílvia Maria Baeta Cavalcanti (UFF)

Prof. Dr.: Marciano Viana Paes (IOC/FIOCRUZ)

Prof^a. Dr^a. Andréa Alice da Silva (UFF)

Rio de Janeiro, 20 de junho de 2018.

DEDICATÓRIA

Para a Mãe Divina e o Pai Celestial, fontes de toda fé e amor.

*E também aos meus maiores alicerces:
minha irmã Letícia Santos Barbosa;
minha avó, Maria Lúcia Lobato Ferreira (in memoriam)
e meus pais, Mauro Ivan Coelho Barbosa & Ana Maria Santos Barbosa.*

AGRADECIMENTOS

Um agradecimento muito especial e fundamental à minha orientadora, **Profa Dra. Elzinandes Leal Azeredo**. Sou profundamente grata por toda a amizade e apoio ao longo desses anos de convivência, todo carinho, paciência e momentos compartilhados. Gratidão pela preciosa oportunidade de ser novamente sua aluna, pelo convite para trilhar o mestrado e por todo alinhamento e crescimento profissional (e principalmente pessoal) que este caminho trouxe.

Agradeço também à **Profa Dra. Luzia Maria de Oliveira Pinto** pela convivência e por seu exemplo profissional que tanto enriquece todos ao seu redor. À **Profa. Dra. Claire Fernandes Kubelka** pela confiança depositada e por todas as oportunidades concedidas.

À **Profa Dra Flavia Barreto** por seu imenso entusiasmo e enorme contribuição na orientação dos diagnósticos.

Agradeço a toda equipe do Laboratório de Imunologia Viral (FIOCRUZ/IOC): **Jéssica Badolato, Thiara Souza, Márcio Cipitelli, Iury Paiva, Dr. Juan Camilo, Dra. Luciana Gomes, Dra. Priscila Conrado, Dra. Monique Lima, Dra. Manoela Heringer, Dr. Alex Pauvolid, Thais Choin, Dra. Fernanda Bruycker, Gabriel Guimarães, Helver Dias, Patrick Jesus** e também aos eternos “LIVianos”: **Dra. Nieli Faria, Dra. Amanda Torrentes e Dra. Mariana Gandini**. Gratidão por criarem um excelente ambiente de trabalho: divertido, respeitoso e colaborativo. Muito especialmente agradeço à **Jéssica e Thiara** pelo enorme apoio nos experimentos, pela revisão dos conteúdos e por momentos memoráveis no trabalho de campo. Destaco também o apoio do querido **Juan** por toda ajuda técnica e científica, além de todas as sugestões para enriquecer o trabalho. Além disso, agradeço à **Priscila** pelo apoio técnico e por todas as caronas (e as boas conversas e risadas do caminho).

Agradeço a colaboração preciosa de **Ana Lúcia Bastos**, pelo cuidado na preparação e esterilização do material utilizado neste trabalho e também aos responsáveis pelo apoio laboratorial: **Maila Fernandes, Michelle Lucena e Filipe Silva**.

Gratidão imensa ao **Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha**, grande profissional da medicina e líder do trabalho de campo que deu início ao mestrado, pela oportunidade dos momentos de aprendizado compartilhados. Agradeço também à **Dra Marcia Dal Fabro, Izi Romanholi**, a toda a **equipe da UPA Coronel Antonino (MS)** e aos **pacientes** envolvidos na pesquisa.

À Dra **Ana Rita Motta Castro (UFMS)**, por gentilmente nos apoiar nos trabalhos de campo, cedendo a estrutura de seu laboratório e caloroso acolhimento de sua equipe: **Larissa Bandeira, Marco Puga, Rita Benevides Sabrina Torres, Grazielli Rezende e Adriana França**.

Ao **Laboratório de Flavivírus**, por seu apoio no diagnóstico. Agradeço também o apoio e carinho da **Dra. Patrícia Carvalho de Sequeira**.

Agradeço ao **Programa de Pós-graduação em Medicina Tropical do Instituto Oswaldo Cruz/FIOCRUZ**, em particular ao apoio de **Lívia Mangeon e Gisélia Ricardo**. Um agradecimento especial à **Profa Dra Martha Suarez Mutis** pela forma amorosa com a qual conduz o curso. Gratidão por toda compreensão e ajuda nos momentos mais difíceis do percurso. Agradeço também a todos os **docentes do curso** e a todos os **amigos do mestrado, representados por: Andressa Cazote, Nathália Alves, Thamiris Bhaltazar, Natália Gedeão, Allison Fabri, Suelen Soares e Luzilene Souza**.

À **plataforma de Luminex da Fundação Oswaldo Cruz**, pelo auxílio.

Aos **membros da banca** pela gentileza de aceitarem o convite para avaliar esta dissertação: **Profa. Dra. Adriana Vallochi (IOC/FIOCRUZ), Prof. Dr. Marciano Paes (IOC/FIOCRUZ) e Profa. Dra. Andréa Alice da Silva (UFF) e Profa. Dra. Sílvia Cavalcanti (UFF)**. Agradeço especialmente à **Profa Dra Roberta Olmo Pinheiro (IOC/FIOCRUZ)** pela revisão do texto.

Ao **Instituto Oswaldo Cruz** por fornecer a infraestrutura necessária para a realização deste projeto. Ao auxílio científico e apoio financeiro das agências **CNPq e FAPERJ**.

Agradeço ao **Prof. Dr. Maurício Cardoso Arouca (COPPE/UFRJ)** e à querida **Silvia Paulo de Azevedo** pelo enorme incentivo para entrada na pós-graduação e também por todas as oportunidades profissionais concedidas. Preciso agradecer também aqueles que foram amigos de trabalho e grandes conselheiros: **Prof. Dr. Alan Emanuel Dualibe Ribeiro, Daniel Coelho e Prof. Dr. Júlio César Bispo** por todos os momentos compartilhados, que certamente contribuíram para que eu pudesse galgar novos horizontes.

À toda a **equipe dos Laboratórios de Genética e Multidisciplinar do IPPMG/UFRJ**, cujo apoio foi essencial: **Profa Dra. Cecília Menks, Dra. Amanda Figueiredo, Miriam Goulart, Amanda Oliveira, Gabriele Rodrigues, Dra. Daniela Garcia, Prof. Dr. Marcelo Land, Dra. Fabiana Vieira, Elen de Oliveira, Patrícia Siqueira, Robéria Mendonça, Maria Clara Canellas, Nathália Lopez e Ângela Borges** (que cuida de todos nós!). Agradeço imensamente à **Monique Oliveira** pela atenciosa revisão das referências bibliográficas. Muito especialmente agradeço à **Sandra Alves Peixoto Pellegrini e Profa Dra Elaine Sobral da Costa** por toda confiança e por terem me recebido no laboratório com tanto carinho. Ainda no IPPMG, agradeço a ajuda do **Breno Rodrigues** e o apoio de: **Dra Márcia Ribeiro, Eduardo Pernambuco, Dr. Edimilson Migowski** e do diretor **Bruno Leite**, que ajudaram na transição para o IPPMG e colaboraram com o término do mestrado.

Aos amigos de vida inteira e às famílias adotivas que me acolheram ao longo de toda existência: **Elizabeth Agra e Maria de Lourdes Sczip** (*In memoriam*), **Cláudio Sato, Vanessa Sato, Luiza Sato e Laura Sato**. Aos meus pais adotivos: **Isabel de Souza Sato e Eisuke Sato**. Sei o quanto vibram por cada passo meu, então só me resta agradecer pela imensa sorte de ter por perto tanto amor e afetuoso suporte.

Um agradecimento muito particular à **Milla Scramignon e Juliana DeCastro** que foram fundamentais em todas as etapas dessa caminhada. Carinho e companheirismo que nunca poderei mensurar em palavras.

Aos queridos **Allan Alvarenga, Luís Barros e Jaime Cordeiro**, agradeço à gigante irmandade construída ao longo desses anos. Ao **Allan**, agradeço também pela ajuda na revisão do texto e por ter me apresentado ao laboratório!

Aos amigos mais próximos e aos companheiros das diversas escolas de desenvolvimento pessoal: **Nathália Lopez Duarte, Laina Martins Cunha, Samantha Cândido Oliveira, Amanda Oliveira, Lidiane Albuquerque, Leandro de Souza Thiago, Fábio Costa, Adriana Lima, Deise Garcia, Cynthia Cunha, Roberto Gomes (e os pequenos Mariana, Beatriz e Lucas), Mariana Costa Rodrigues, Eliane Arruda, Liane Heleniaz, Luciana Neves, Juliana Medeiros, Valesca Medeiros, Iara Dantas, Nilva Alcântara e Ana Paula Nader**, agradeço pela imensa torcida, orações, vibrações positivas e apoio emocional.

À minha família pela paciência, incentivo e apoio fundamental, principalmente no encerramento desse ciclo. Ao meu pai, **Mauro Ivan Coelho Barbosa**, cujo exemplo, amor e valores reverberam em todos os momentos. À **Leticia Santos Barbosa**, minha irmã, por compartilhar comigo a jornada da vida e por apoiar todos os meus passos. À minha mãe, **Ana Maria Santos Barbosa**, por me conceder a existência e por ter plantado as sementes do apreço ao estudo. À minha querida avó, **Maria Lúcia Lobato Ferreira** (*in memoriam*) e tias Ana Lúcia de Carvalho Costa e Ana Paula Ribas de Carvalho, por todo apoio na minha criação. Às minhas afilhadas, **Rayanne Costa Ferro e Thuany Ribas Dornellas Pereira** por toda a torcida e orações.

A todos que contribuíram de alguma forma para a realização desse trabalho, minha sincera gratidão.

Finalmente, rendo graças à **Mãe Divina**, ao **Pai Celestial** e a todos os **Mestres e amigos espirituais** pela oportunidade de estar nesse tempo e espaço, em intenso aprendizado, cercada de anjos a iluminar e alegrar o caminho.

O impulso é cego, exceto quando há conhecimento.
E todo conhecimento é vazio; exceto quando há trabalho;
e todo trabalho é vazio; exceto quando há amor.
O trabalho é amor feito visível”

Kalil Gilbran

RESUMO

Em 2016, vivenciou-se no Brasil uma grande epidemia de arbovírus como dengue (DENV) e Zika (ZIKV), com impactos na infraestrutura da saúde pública brasileira, turismo e economia. Fatores do hospedeiro, virais e epidemiológicos têm sido associados à patogênese dessas doenças. No entanto, os mecanismos envolvidos em cada arbovirose isoladamente ainda não são completamente compreendidos. Desta forma, o presente trabalho teve como objetivos investigar casos suspeitos de infecção pelos arbovírus DENV e ZIKV, assim como avaliar os parâmetros clínico-laboratoriais e imunológicos de casos confirmados durante epidemia ocorrida em Mato Grosso do Sul (MS), Brasil, durante o ano 2016. Para isto, amostras agudas de pacientes (n= 134) com síndrome de febre aguda suspeita de infecção arboviral, foram investigadas entre fevereiro e março de 2016, em Campo Grande (MS). Paralelamente, realizamos a quantificação de citocinas e quimiocinas circulantes, através de ensaios imunoenzimáticos (ELISA e/ou Luminex). Todas as amostras foram coletadas na fase aguda da doença e submetidas ao diagnóstico de ZIKV e DENV, por técnicas moleculares e sorológicas. Foi investigada também a infecção pelo vírus chikungunya (CHIKV). O diagnóstico laboratorial de infecção por arbovírus foi confirmado em 107/134 (79,8%) amostras através da utilização de técnicas sorológicas e/ou moleculares. Os métodos moleculares (RT-PCR) demonstraram que 87/134 (64,9%) das amostras avaliadas foram confirmadas para ZIKV e/ou DENV. Destes, 51 (58,6%) pacientes apresentaram monoinfecção por DENV, 18 (20,7%) monoinfecção por ZIKV e 18 (20,7%) coinfeção por DENV/ZIKV. DENV-1 (62/ 89,9%) e DENV-4 (7/ 10,1%) foram os sorotipos infectantes detectados. Nenhum caso foi positivo para CHIKV pelo método molecular, no entanto em sete (5,6%) pacientes havia presença de anticorpos anti-CHIKV da classe IgM, sugerindo infecção recente por CHIKV e cocirculação deste vírus na região, no período da epidemia em questão. Os sintomas comuns incluíram febre, exantema, artralgia, mialgia, fadiga, cefaleia e hiperemia conjuntival. Observamos que prostração e vômitos foram significativamente associados à monoinfecção pelo DENV. Por outro lado, prurido e edema, foram mais associados à monoinfecção pelo ZIKV. Em relação aos parâmetros laboratoriais, os pacientes monoinfectados pelo DENV apresentaram maiores níveis de ALT/TGP em comparação com o grupo monoinfectado pelo ZIKV. A maioria dos pacientes DENV/ZIKV (80%) apresentou manifestações clínicas leves. Por outro lado, alguns pacientes monoinfectados foram hospitalizados e receberam hidratação venosa, reforçando a importância do manejo clínico adequado desses pacientes e reconhecimento precoce de sinais de alarme. No grupo de pacientes estavam incluídas onze gestantes, três apresentaram monoinfecção pelo ZIKV, cinco monoinfecção pelo DENV, duas coinfeção com DENV-1/ZIKV e uma ODF. Foram observados desfechos normais do parto, com exceção de um óbito por insuficiência respiratória de um bebê nascido de mãe coinfectada por DENV-1/ZIKV. Todos os pacientes infectados por DENV ou ZIKV apresentaram elevados níveis circulantes de IP10/CXL10, CCL2/MCP-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6 e IL-15, comparados aos controles. Pacientes coinfectados por DENV/ ZIKV exibiram elevados níveis IP10/CXL10 e TNF- α ; e menores níveis de RANTES/CCL5 em relação aos controles. Ainda, níveis significativamente menores de IL-4, IL-6 e de MIP1 α /CCL3 foram detectados em gestantes infectadas pelo ZIKV quando comparadas às gestantes saudáveis. Nossos resultados demonstraram que os sinais e sintomas apresentados pelos pacientes foram semelhantes, confirmando a dificuldade no diagnóstico clínico diferencial. No entanto, observamos que os níveis circulantes de AST/TGP foram significativamente maiores em pacientes infectados pelo DENV. Além disso, elevados níveis de citocinas e quimiocinas encontrados no nosso estudo corroboram com as semelhanças de sinais e sintomas clínicos desencadeados por estes vírus. O mecanismo envolvido com a maior produção IP10/CXL10 e TNF- α e menor produção de RANTES/CCL5 nos pacientes coinfectados são ainda desconhecidos. Estudos futuros serão necessários na elucidação da imunopatogenia da coinfeção DENV/ZIKV.

ABSTRACT

In 2016, an epidemic of arbovirus like dengue (DENV) and Zika (ZIKV) was experienced in Brazil, with impacts on the Brazilian infrastructure public health, tourism and economy. Host, viral and epidemiological factors have been associated with the pathogenesis of these diseases. However, the mechanisms involved in each arbovirose alone are not yet fully understood. Thus, the present study aimed to investigate suspected cases of infection by arboviruses DENV and ZIKV, as well as to evaluate the clinical and laboratory parameters of confirmed cases during 2016 Mato Grosso do Sul (MS)/Brasil outbreak. For this, acute samples of patients (n = 134) with acute fever syndrome suspected of arboviral infection were investigated between February and March 2016, in Campo Grande (MS). In parallel, we performed the cytokine and circulating chemokine dosage using immunoenzymatic assays (ELISA and / or Luminex). All samples from suspected cases were collected in the acute phase of the disease and submitted to the diagnosis of ZIKV and DENV, by molecular and serological techniques. Chikungunya virus (CHIKV) infection was also investigated. The laboratory diagnosis of arbovirus infection was confirmed in 107/134 (79.8%) samples using serological and/or molecular techniques. Molecular methods (RT-PCR) demonstrated that 87/134 (64.9%) of the samples tested were confirmed for ZIKV and / or DENV. Of these, 51 (58.6%) patients presented monoinfection by DENV, 18 (20.7%) monoinfection by ZIKV and 18 (20.7%) coinfection by DENV / ZIKV. DENV-1 (62 / 89.9%) and DENV-4 (7 / 10.1%) were the infectious serotypes detected. No case was positive for CHIKV by the molecular method, however in seven (5.6%) patients there was presence of anti-CHIKV antibodies of the IgM class, suggesting recent infection by CHIKV and co-circulation of this virus in the region during the period of the epidemic in question. Common symptoms included fever, rash, arthralgia, myalgia, prostration, headache, and conjunctivitis. Statistical analysis showed that pruritus and edema were associated with ZIKV infection while prostration and vomiting were more associated with dengue. On the other hand, pruritus and edema were more associated with ZIKV monoinfection. Regarding the laboratory parameters, monoinfected DENV patients presented higher levels of ALT/TGP compared to ZIKV monoinfection. Most patients coinfecting with DENV/ZIKV (80%) presented mild clinical manifestations. On the other hand, some monoinfected patients were hospitalized and received venous hydration reinforcing the importance of adequate clinical management of these patients and early warning signs recognition. Eleven pregnant women were included in the group of patients, three presented monoinfection by ZIKV, five monoinfection by DENV, two coinfection with DENV-1/ZIKV and one ODF. Normal birth outcomes were observed except for one death due to respiratory insufficiency and one baby presenting positional plagiocefaly, both born of coinfecting DENV-1/ZIKV mothers. All patients infected by DENV or ZIKV had high circulating levels of IP10 / CXL10, CCL2 / MCP-1, TNF- α , IFN- γ , IL-6 and IL-15, compared to controls. Patients coinfecting with DENV / ZIKV exhibited high levels IP10 / CXL10 and TNF- α ; and lower levels of RANTES / CCL5 compared to controls. Furthermore, significantly lower levels of IL-4, IL-6 and MIP1 α / CCL3 were detected in ZIKV infected pregnant women when compared to healthy pregnant women. Our results demonstrated that the signs and symptoms presented by the patients were similar, confirming the difficulty in the differential clinical diagnosis. However, we observed that circulating levels of AST / TGP were significantly higher in patients infected with DENV. In addition, high levels of cytokines and chemokines in mono or coinfecting patients found in our study corroborate the similarities of clinical signs and symptoms elicited by these viruses. The mechanism involved with increased production IP10 / CXL10 and TNF- α and lower production of RANTES / CCL5 in coinfecting patients are still unknown. Future studies will be needed to elucidate the immunopathogeny of DENV / ZIKV coinfection.

ÍNDICE DE FIGURAS

FIGURA 1: Partículas virais e organização de genomas de Flavivirus e Alfavírus	2
FIGURA 2: Mapa mostrando a estimativa da distribuição global de Dengue, Zika e Chikungunya.	2
FIGURA 3: Casos de dengue, dengue grave e óbitos notificados no Brasil, 1986-2018.	7
FIGURA 4: Ciclo de replicação do vírus dengue.	10
FIGURA 5: Classificação da Dengue quanto à gravidade clínica, de acordo com WHO 2009.	12
FIGURA 6: Fases de evolução da dengue.	15
FIGURA 7: Modelo de ADE para a infecção por dengue.	17
FIGURA 8: Ilustração do fenômeno do pecado original antigênico em dengue.	18
FIGURA 9: Distribuição espacial do ZIKV no Brasil.	24
FIGURA 10: Áreas de transmissão do ZIKV.	25
FIGURA 11: Vias de transmissão do ZIKV.	28
FIGURA 12: Transmissão vertical e síndrome congênita induzida pelo ZIKV.	31
FIGURA 13: Neonato normal e com síndrome congênita do ZIKA.	31
FIGURA 14: Tropismo do vírus Zika.	35
FIGURA 15: Esquema do desenho experimental do estudo.	42
FIGURA 16: Procedência dos casos suspeitos de infecção por arbovírus.	42
FIGURA 17: Diagnóstico molecular diferencial de casos suspeitos de infecção pelos arbovírus DENV e/ou ZIKV	51
FIGURA 18: Percentual de monoinfecção pelo DENV ou pelo ZIKV e coinfeções entre DENV e ZIKV	53
FIGURA 19: Frequência dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 nos pacientes monoinfectados pelo DENV e coinfectados com ZIKV/DENV. Na análise foram consideradas apenas amostras positivas através da RT-PCR.	54
FIGURA 20: Valores de CT por RT-PCR em tempo real para os casos de DENV, ZIKV e DENV/ZIKV.	55
FIGURA 21. Sinais e Sintomas de pacientes monoinfectados pelo ZIKV e DENV e coinfectados por DENV/ZIKV.	59
FIGURA 22: Valores percentuais de Hematócrito (A) e Contagem de plaquetas(B) em pacientes monoinfectados pelo DENV, ZIKV, coinfectados com DENV e ZIKV e ODF.	60
FIGURA 23. Contagem de leucócitos (A), linfócitos (B) e monócitos (C) em pacientes monoinfectados pelo DENV, ZIKV, coinfectados com DENV/ZIKV e ODF.	61
FIGURA 24: Quantificação de enzimas hepáticas nos diferentes grupos de estudo.	62
FIGURA 25: Quantificação de citocinas circulantes em pacientes monoinfectados pelo DENV, monoinfectados pelo ZIKV ou coinfectados com DENV/ZIKV.	65
FIGURA 26: Quantificação de quimiocinas circulantes em pacientes monoinfectados pelo DENV, monoinfectados pelo ZIKV ou coinfectados com DENV/ZIKV.	66
FIGURA 27: Quantificação de citocinas e quimiocinas circulantes em gestantes saudáveis e infectadas pelo DENV ou ZIKV.	72

LISTA DE TABELAS E QUADROS

TABELA 1: Kits de ELISA e Luminex utilizados	49
TABELA 2: Características demográficas e parâmetros laboratoriais do pacientes estudados durante a tripla epidemia em Campo Grande, MS, Brasil, 2016	52
TABELA 3. Diagnóstico Laboratorial para casos suspeitos de infecção por arbovírus (n=134) analisados na epidemia ocorrida em 2016 em Campo Grande, MS, Brasil.....	53
TABELA 4: Frequência de anticorpos anti-DENV da classe IgM e da proteína NS1 circulantes em pacientes apresentando DENV, ZIKV ou coinfectados ZIKV/DENV.	55
TABELA 5: Distribuição dos casos confirmados de acordo com a região do Mato Grosso do Sul.....	56
TABELA 6: Características clínicas e demográficas dos pacientes de acordo com o tipo de infecção durante a tríplice epidemia ocorrida em Campo Grande, MS, Brasil, 2016.	58
TABELA 7: Associações entre as citocinas, quimiocinas e parâmetros laboratoriais.	67
Tabela 8: Características clínicas e demográficas de gestantes incluídas no estudo.	69
TABELA 9: Fatores solúveis quantificados em gestantes saudáveis e infectadas com DENV e/ou ZIKV.....	71
QUADRO 1: Métodos de diagnóstico laboratorial empregados para a investigação de casos suspeitos de dengue, zika e chikungunya durante a tríplice epidemia ocorrida no Mato Grosso do Sul, MS, Brasil em 2016.....	45

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ADE	<i>Teoria da facilitação dependente de anticorpos (Antibody Dependent Enhancement)</i>
<i>Ae. aegypti</i>	<i>Aedes aegypti</i>
C	Proteína do capsídeo ou Core
C6/36	Célula de mosquito <i>Ae.albopictus</i> clone 6 passagem 36
CCL-3	Ligante 3 de quimiocina (<i>C motif chemokine ligand 3</i>)
CCL-5	Ligante 5 de quimiocina (<i>C motif chemokine ligand 5</i>)
CDC	Centro de controle e prevenção de doenças (<i>Centers for Disease Control and Prevention</i>)
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CHIKV	Vírus chikungunya
CXCL-10	Receptor 10 para quimiocina CXC
DCs	Células dendríticas (<i>Dendritic cells</i>)
DC-SIGN	Ligante de molécula de adesão intercelular não integrina específica de células dendríticas (<i>Dendritic cell ICAM-3 grabbing non integrin</i>).
DENV	Vírus dengue
DENV-1	Vírus dengue sorotipo 1
DENV-2	Vírus dengue sorotipo 2
DENV-3	Vírus dengue sorotipo 3
DENV-4	Vírus dengue sorotipo 4
ECP	Efeito citopático
ELISA	Ensaio imunoenzimático
FD	Febre do dengue
FDSA	Febre do dengue com sinais de alarme
FGF	Fator de Crescimento de Fibroblastos (<i>Fibroblast Growth Factor</i>)
FHD	Febre Hemorrágica por Dengue
GM-CSF	Fator Estimulador de Colônias de Granulócitos-Macrófagos (<i>Granulocyte - Macrophage Colony-Stimulating Fator</i>)
IFI	Imunofluorescência indireta
IFN-	Interferon gama
IFN- α	Interferon alfa
IFN- β	Interferon beta
IgG	Imunoglobulina da classe G
IgM	Imunoglobulina da classe M
IL-1RA	Receptor antagonista da interleucina 1 (<i>Interleukin-1 receptor antagonist</i>)
IL-1 β	Interleucina 1- β (<i>Interleukin-1β</i>)
IL-2	Interleucina 2 (<i>Interleukin-2</i>)

IL-2R	Receptor de interleucina 2 (<i>Interleukin-2 receptor</i>)
IL-2RA	Receptor de cadeia alfa da interleucina 2 (<i>Interleukin-2 receptor alpha chain</i>)
IL-4	Interleucina 4 (<i>Interleukin-4</i>)
IL-6	Interleucina 6 (<i>Interleukin-6</i>)
IL-7	Interleucina 7 (<i>Interleukin-7</i>)
IL-8	Interleucina 8 (<i>Interleukin-8</i>)
IL-10	Interleucina 10 (<i>Interleukin-10</i>)
IL-12	Interleucina 12 (<i>Interleukin-12</i>)
IL-13	Interleucina 13 (<i>Interleukin-13</i>)
IL-15	Interleucina 15 (<i>Interleukin-15</i>)
IL-17	Interleucina 17 (<i>Interleukin-17</i>)
IL-18	Interleucina 18 (<i>Interleukin-18</i>)
IP10	Proteína 10 induzida por interferon gama (<i>Interferon gamma-induced protein 10</i>)
MAC-ELISA	Ensaio imunoenzimático de captura do anticorpo M (<i>IgM antibody-capture enzyme-linked immunosorbent assay</i>)
MCP1	proteína quimiotática de monócitos-1 (<i>Monocyte chemoattractant protein-1</i>)
MIF	Fator inibitório da migração de macrófagos (<i>Macrophage migration inhibitory factor</i>)
MIG	Monoquina induzida por interferon gama 1 (<i>Monokine induced by gamma interferon</i>)
MIP-1 α	Proteína inflamatória de macrófago 1 alfa (<i>macrophage inflammatory protein 1-alpha</i>)
MIP-1 β	Proteína inflamatória de macrófago 1 beta (<i>macrophage inflammatory protein 1-beta</i>)
MS	Ministério da Saúde
NK	Célula matadora natural (<i>Natural Killer</i>)
NS1	Proteína não estrutural 1 (<i>non-structural protein 1</i>)
OPAS	Organização Pan-Americana da Saúde
ORF	Sequência de leitura aberta (open reading frame)
PAHO	Organização Pan-Americana da Saúde (<i>Pan American Health Organization</i>)
PAMPs	Padrões moleculares associados a patógenos (<i>pathogen-associated molecular pattern</i>)
PBS	Tampão fosfato-salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PCR	Reação em Cadeia da Polimerase
Poli-A	Cauda de poliadenilato
PRNT	Teste de neutralização por redução de placa
PRRs	Receptores de reconhecimento de padrões (<i>pattern recognition receptors</i>)
qRT-PCR	Transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real
RANTES	Ligante 5 de quimiocina/regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais (<i>regulated upon activation normal T cell expressed and secreted</i>)
RIG-I	Gene I induzível de ácido retinóico (<i>retinoic acid-inducible gene-1</i>)

RLRs	Receptores semelhantes à RIG (<i>RIG-I-like receptors</i>)
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase
SCD	Síndrome do Choque por Dengue
SGB	Síndrome de <i>Guillain-Barré</i>
SVS	Secretaria de Vigilância em Saúde
SCZ	Síndrome Congênita por Zika
TGO/AST	Aspartato Aminotransferase/Transaminase Glutâmico-Oxalacética
TGP/ALT	Alanina Aminotransferase/Transaminase Glutâmico-Pirúvica
Th1	Linfócito T auxiliar 1 (<i>T helper 1</i>)
Th17	Linfócito T auxiliar 17 (<i>T helper 17</i>)
Th2	Linfócito T auxiliar 2 (<i>T helper 2</i>)
TLR3	Receptor <i>toll-like</i> 3 (toll-like receptor 3)
TLR7	Receptor <i>toll-like</i> 7 (toll-like receptor 7)
TLR8	Receptor <i>toll-like</i> 8 (toll-like receptor 8)
TLRs	Receptores <i>toll-like</i> (toll-like receptors)
TMB	3',3',5',5'- <i>tetrametilbenzidina</i> (3',3',5',5'- <i>tetramethylbenzidine</i>)
TNF- α	Fator de necrose tumoral - alfa (<i>tumor necrosis factor - alpha</i>)
Tregs	Células T reguladoras (regulatory T cells)
UPA	Unidade de Pronto Atendimento
VERO	Célula de rim de macaco verde africano (<i>kidney epithelial cells extracted from an african green monkey</i>)
WHO	Organização Mundial da Saúde (<i>World Health Organization</i>)
ZIKV	Vírus Zika

SUMÁRIO

I.	INTRODUÇÃO	1
1	OS ARBOVÍRUS	1
2	DENGUE	3
2.1	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA	3
2.2	CICLO DE TRANSMISSÃO DO DENV	8
2.3	CÉLULAS- ALVO E REPLICAÇÃO.....	9
2.1	CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS DA DENGUE.....	11
2.2	ESPECTRO CLÍNICO DA DENGUE.....	13
2.2.1	Fase Febril.....	13
2.2.2	Fase Crítica (Defervescência).....	13
2.2.3	Fase de Recuperação (Convalescente).....	15
2.3	PATOGÊNESE.....	16
2.3.1	Facilitação da Infecção Dependente de Anticorpos.....	16
2.3.2	Pecado Antigênico Original	18
2.3.3	“Tempestade” de Citocinas e Extravasamento Vascular	19
2.3.4	Virulência Viral.....	20
3	ZIKA.....	21
3.1	HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA	21
3.2	FORMAS DE TRANSMISSÃO DO ZIKV	26
3.3	MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO PELO ZIKV.....	29
3.4	SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKV	29
3.5	COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS PELA INFECÇÃO POR ZIKV	30
3.6	PATOGÊNESE DO ZIKV	32
3.6.1	Tropismo Viral	32
3.6.2	Resposta Imune a Infecção Pelo ZIKV : reatividade cruzada entre ZIKV e DENV.....	36
4	DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	37
II.	JUSTIFICATIVA	39
III.	OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS	40
5	Objetivo Geral.....	40
5.1	OBJETIVOS ESPECÍFICOS:.....	40
IV.	MATERIAIS E MÉTODOS	41
6	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:.....	41
7	DESENHO DE ESTUDO.....	41
8	POPULAÇÃO DE ESTUDO	41
8.1	INVESTIGAÇÃO DE CASOS SUSPEITOS DE INFECÇÃO PELO DE DENV, ZIKV OU CHIKV NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL, A PARTIR DE UMA TRÍPLICE EPIDEMIA DE ARBOVIROSES OCORRIDA EM 2016 NA CIDADE DE CAMPO GRANDE (MS).....	41
8.2	DEFINIÇÃO DE CASO.....	43
8.3	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL.....	43
8.3.1	Extração do Rna Viral.....	44
8.3.2	Quantificação de Anticorpos da Classe IgM para DENV	44
8.3.3	Teste de Captura do Antígeno NS1 de DENV	45
8.3.4	Infecção Primária e Secundária	45
8.3.5	RT-PCR para Detecção e Tipagem dos DENV	45
8.3.6	RT-PCR para Detecção do ZIKV	45
8.3.7	Quantificação De Anticorpos Da Classe Igm Para CHIKV (MAC-ELISA)	46
8.3.8	RT-PCR Em Tempo Real (Qrt-PCR) Para Detecção De CHIKV.....	46
8.3.9	RT-PCR Para Detecção Do Vírus Mayaro (MAYV)	46
8.4	CASO CONFIRMADO DE INFECÇÃO PELO DENV, ZIKV OU CHIKV.....	46
8.5	CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS CASOS CONFIRMADOS.....	46
8.6	PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS	47

8.7	ENSAIOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS (CITOCINAS/QUIMIOCINAS) E FATORES DE CRESCIMENTO.....	47
8.7.1	Caracterização do Perfil de Produção de Citocinas e Quimiocinas por Elisa.....	47
8.7.2	Detecção De Citocinas E Fatores De Crescimento Por Luminex.....	49
6.1	ANÁLISES ESTATÍSTICAS:	50
V.	RESULTADOS	51
9	POPULAÇÃO DO ESTUDO.....	51
9.1	DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS.....	51
9.1.1	Coinfecções.....	53
9.2	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS: CARACTERIZAÇÃO POR LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS PACIENTES	56
9.3	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES INFECTADOS COM DENV E ZIKV56	
9.4	DESFECHO CLÍNICO NOS PACIENTES MONOINFECTADOS PELO DENV E COINFECTADOS DENV/ZIKV	57
9.5	CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DIFERENCIAIS	60
10	Quantificação de quimiocinas e Citocinas	63
10.1	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA	65
10.2	QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS POR ELISA	66
10.3	CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS CIRCULANTES DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS COM OS PARÂMETROS LABORATORIAIS	67
11	Características clínicas, demográficas e imunológicas de gestantes.....	68
11.1	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM GESTANTES.....	70
VI.	DISCUSSÃO DOS RESULTADOS	73
VII.	CONCLUSÕES	82
VIII.	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	84
IX.	ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	103
X.	ANEXO B - FICHA CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA	105
XI.	ANEXO C - TEMA DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	107
XII.	ANEXO D – ARTIGOS PUBLICADOS.....	109

I. INTRODUÇÃO

1. OS ARBOVÍRUS

O termo arbovírus se refere a vírus transmitidos por vetores artrópodes (*Arthropod-borne virus*). São transmitidos aos humanos principalmente através da picada de mosquitos e carrapatos infectados. Os arbovírus são membros de cinco famílias: *Bunyaviridae*, *Togaviridae*, *Flaviviridae*, *Reoviridae* e *Rhabdoviridae* (Doughty *et al.* 2017).

A família *Flaviviridae* é composta pelos gêneros *Flavivirus*, *Pegivirus*, *Pestivirus* e *Hepacivirus*. O vírus da Febre Amarela (YFV, *Yellow Fever Virus*), vírus do Oeste do Nilo (WNV, *West Nile virus*), vírus da Encefalite Japonesa (JEV, *Japanese encephalitis virus*), vírus Dengue (DENV, *Dengue virus*) e vírus Zika (ZIKV, *Zika virus*) representam membros de importância médica do gênero *Flavivirus*, responsáveis por altos índices mortalidade e morbidade ao redor do mundo. Membros da família *Flaviviridae* compartilham várias características em comum. São vírus esféricos com tamanho entre 40-65nm e simetria icosaédrica. O genoma é composto de fita simples de RNA (Ácido Ribonucleico) com polaridade positiva com cerca de 10.000-11.000 pares de bases, contendo uma única sequência de leitura aberta (ORF, *open reading frame*) codificando uma poliproteína posteriormente clivada em três proteínas estruturais (C, prM/M, E) e sete não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) (Paul & Bartenschlager 2015) (FIGURA 1).

A família *Togaviridae* é composta pelos gêneros *Alphavirus* e *Rubivirus*. Existem inúmeros *Alphavirus* causadores de arboviroses, por exemplo, o vírus do Rio Ross (RRV, *Ross River Virus*), o vírus Mayaro (MAY, *Mayaro Virus*) e o vírus Chikungunya (CHIKV, *Chikungunya virus*). Os *Alphavirus* são pequenos vírus envelopados e esféricos, com um diâmetro de 60-70 nm. O genoma é composto por molécula de RNA de fita simples e polaridade positiva, que codifica quatro proteínas não estruturais (NSP1-4) e três estruturais (C, E1, E2) (Kuno *et al.* 2017) (FIGURA 1).

Atualmente, as arboviroses transmitidas por mosquitos, causadas pelos gêneros *Alphavirus* (CHIKV) e *Flavivirus* (DENV, ZIKV e YFV), representam as enfermidades epidêmicas mais importantes do Brasil (FIGURA 2) (Fuller *et al.* 2017).

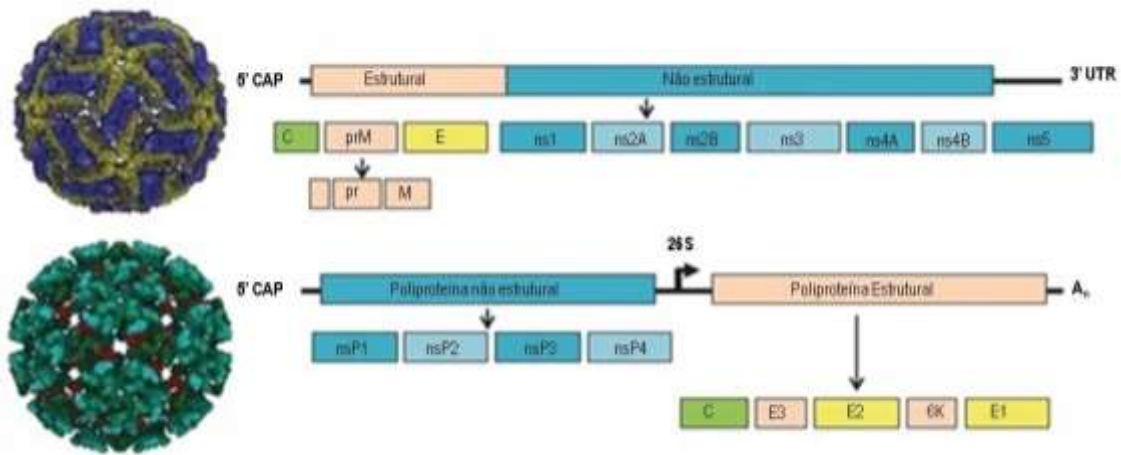


FIGURA 1: Partículas virais e organização de genomas de *Flavivirus* (A) e *Alfavírus* (B). Na esquerda, típicos vírions de *Flavivirus* e *Alfavírus*. Na direita: Representação esquemática dos genomas e poliproteínas virais. Fonte: Adaptado de Fros, 2015.

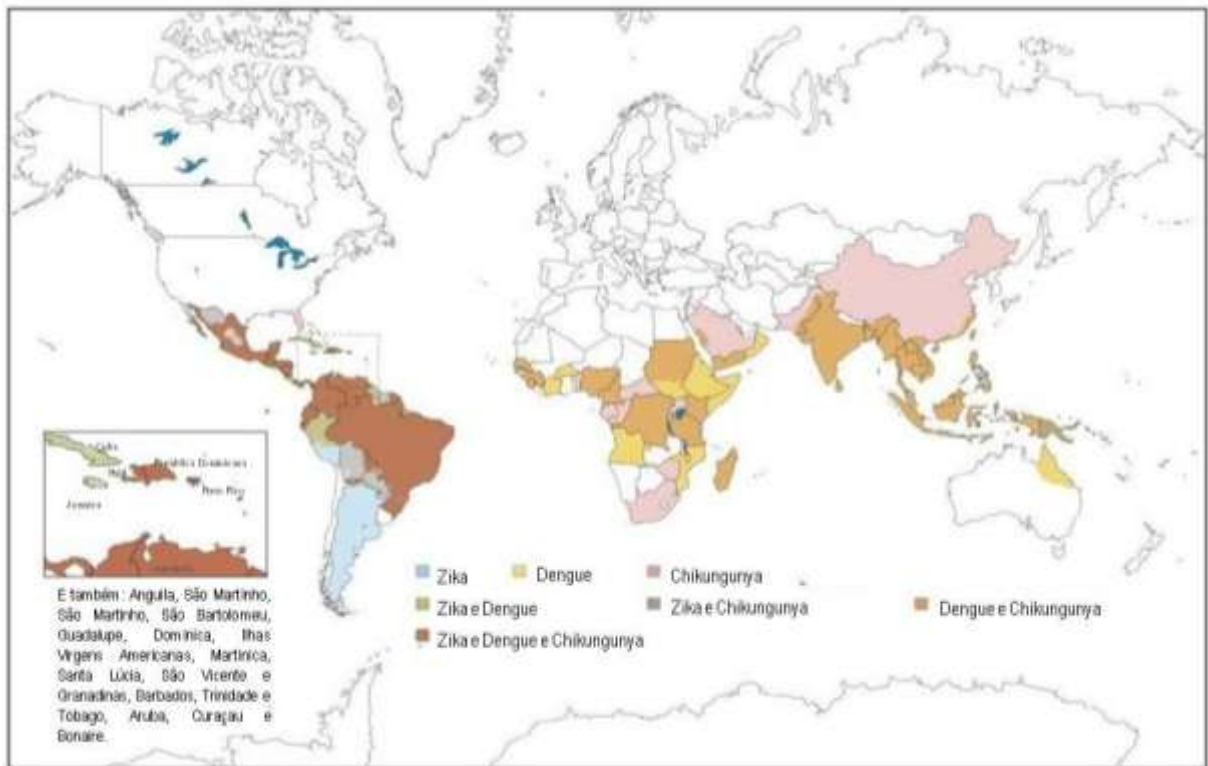


FIGURA 2: Mapa mostrando a estimativa da distribuição global de Dengue, Zika e Chikungunya. Adaptado de Patterson et al. 2016.

2. DENGUE

A dengue é uma enfermidade de etiologia viral, causada pelo DENV. Quatro sorotipos são descritos (DENV 1 a 4) e estes, compartilham uma homologia aproximada de 65% de seu genoma. Os DENV causam uma doença febril aguda de amplo espectro clínico, apresentando tanto formas assintomáticas como formas sintomáticas que podem evoluir para quadros clínicos graves e potencialmente fatais (WHO 2009). A maioria das infecções resulta em uma doença febril autolimitada. A característica marcante dos quadros clínicos mais graves é o aumento da permeabilidade vascular, ocasionando extravasamento plasmático que pode levar ao choque e óbito (Screaton *et al.* 2015).

Constitui a arbovirose mais importante mundialmente, com elevado índice de morbidade e mortalidade, sendo considerada como um grave problema de saúde pública (Guzman & Kouri 2003, Martínez Torres 2008, Liang *et al.* 2015). A dengue é endêmica em mais de 100 países e cerca de 50% da população mundial está em risco de infecção (WHO 2017). O número médio anual de casos da doença aumentou dramaticamente nos últimos anos: cerca de 390 milhões de pessoas infectadas, 96 milhões com sintomas clínicos a cada ano (Bhatt *et al.* 2013). A doença atinge principalmente os países de clima tropical e subtropical, onde o clima quente e úmido favorece a proliferação e desenvolvimento do mosquito vetor (Tauil 2001, Medronho 2006).

2.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

A dengue tem uma longa história de interação humana. Durante o século XIX, foi reconhecida como uma doença esporádica, causando epidemias ocasionais (Rigau-Pérez *et al.* 1998). Embora os primeiros relatos de grandes epidemias de uma doença que poderia ser dengue tenham ocorrido na Ásia, África e América do Norte em 1779 e 1780, coincidindo com o aumento no comércio naval global (Rush 1780, Hirsch & Creighton 1883, Gubler 1998, Weaver & Vasilakis 2009), relatos de doenças clinicamente compatíveis com dengue ocorreram ainda mais cedo. Há registros que descrevem uma doença semelhante à dengue na China já no terceiro século (Gubler 1998).

Após 1780, ocorreu outra série de epidemias que durou de 1823 a 1916, movendo-se da África para a Índia, para a Oceania e para as Américas (Vasilakis & Weaver 2008).

Durante a Segunda Guerra Mundial, mudanças ecológicas, demográficas e epidemiológicas permitiram que o vetor atingisse altas densidades, o que facilitou a dispersão de sorotipos de DENV entre diversas regiões geográficas. Ecologicamente, a destruição dos sistemas de distribuição de água existentes induziu a práticas domésticas de armazenamento de água, e abandono de materiais de guerra ao longo das cidades, o que levou a uma abundância de locais ideais para o desenvolvimento de larvas de

Aedes aegypti (*Ae. aegypti*¹). Além disso, o transporte de tropas e suprimentos por longas distâncias resultou na importação de mosquitos para novas regiões. Essas mudanças ecológicas não apenas aumentaram a densidade de *Ae. aegypti*, mas também expandiram sua distribuição geográfica (Vasilakis & Weaver 2008).

A guerra trouxe um grande número de tropas e refugiados suscetíveis à infecção por DENV, contribuindo para a dispersão do vírus. Entre 1941 e 1945, uma série de epidemias de DENV estava ocorrendo na África Oriental e Caribe, bem como uma pandemia que abrangeu todo o Pacífico (Vasilakis & Weaver 2008).

Os eventos da Segunda Guerra Mundial aumentaram a visibilidade da doença, resultando no estabelecimento de comissões científicas para estudar a dengue e seu agente etiológico. Cientistas japoneses isolaram o DENV-1 (cepa *Mochizuki*) em Nagasaki em 1943, bem como outras cepas de DENV-1 (*Sota e Kin-A*) de pacientes afetados em outras partes do Japão. Mais tarde, Sabin isolou DENV-1 (cepa *Hawaii*) e DENV-2 (cepa *New Guiné C*) de soldados norte-americanos em 1944. O grupo de Sabin também identificou a presença de imunidade homotípica após infecção, e desenvolveu teste de inibição da hemaglutinação para sorodiagnóstico (Weaver & Vasilakis 2009).

Com o fim da guerra e o crescimento descontrolado das cidades, as formas graves da dengue se configuraram como um grande problema de saúde pública no sudeste asiático (Vasilakis & Weaver 2008).

Os primeiros casos bem documentados de pacientes apresentando formas graves foram associados a epidemias na Tailândia e nas Filipinas durante a década de 1950. Os sorotipos de pacientes com doença hemorrágica na epidemia filipina, em 1956, foram os DENV-3 e DENV-4 (Weaver & Vasilakis 2009).

A doença permaneceu localizada no sudeste da Ásia até a década de 1970. Nos anos 80 e 90, no entanto, se espalhou para o oeste na Índia, Paquistão, Sri Lanka e Ilhas Maldivas e para o leste da China, se tornando epidêmica (Gubler 1998, Rigau-Pérez *et al.* 1998). Na sequência temporal, com exceção de um pequeno surto de DENV-3 no Taiti em 1965, a dengue epidêmica esteve ausente do Pacífico Sul por vinte e cinco anos. Em 1971, o DENV-2 foi introduzido e várias ilhas do Pacífico tiveram grandes epidemias (Rigau-Pérez *et al.* 1998).

Nos anos 1950 e 1960, através dos esforços de uma campanha continental de erradicação de mosquitos para prevenir a febre amarela urbana, coordenado pela Organização Pan-Americana da Saúde (OPAS), a maioria dos países da América Central e do Sul foi certificada pela erradicação do principal vetor, o *Ae. aegypti*. O programa foi encerrado no início dos anos 70. No final da década de 1970, *Ae. aegypti* havia reinfestado

¹ O código Internacional de Nomenclatura Zoológica (CINZ), de 2000, em sua última versão, admite a abreviação de gêneros com duas letras e de subgêneros com três. Assim, não é incorreta a adoção da proposta de Reinert (1975-2001) para a nomenclatura de mosquitos, abreviando gênero com duas letras. (Valle *et al.* 2015)

muitos locais. O número de países com dengue epidêmica aumentou acentuadamente durante os anos 80 e 90, à medida que novas cepas e sorotipos virais foram introduzidos. Em 1980, a doença grave era rara, mas, em 1997, estas formas graves haviam emergido como uma entidade da doença em várias epidemias importantes e pequenas em países tropicais e subtropicais das Américas. Os fatores responsáveis por este ressurgimento global da dengue e de suas formas graves incluem: crescimento populacional humano sem precedentes, urbanização não planejada e descontrolada, aumento das viagens aéreas, falta de controle efetivo do mosquito e a deterioração, durante as últimas décadas, da infraestrutura de saúde pública (Gubler & Clark 1995, Rigau-Pérez *et al.* 1998).

No Brasil, existem relatos de que a dengue esteve presente desde 1845, entretanto a doença esteve sob controle até início da década de 80 em decorrência do já mencionado programa de combate de mosquitos para erradicação da febre amarela urbana coordenado pela OPAS (Figueiredo 2000, Barreto & Teixeira 2008). Entre as décadas de 50 e 60, o Brasil e outros países da América Central e Sul, foram certificados como regiões livres do *Ae. aegypti*. Com a descontinuidade da campanha contra a febre amarela no país, ocorreu uma reinfestação das áreas urbanas do território nacional, no final da década de 70 (Barbosa da Silva *et al.* 2002, Braga & Valle 2007). Em 1981, a primeira epidemia de dengue documentada clinicamente e laboratorialmente no Brasil, ocorreu em Boa Vista, Roraima (RR). Tratou-se de uma epidemia causada pelos sorotipos DENV-1 e DENV-4, atingindo cerca 11.000 pessoas (Osana *et al.* 1983).

A doença recebeu atenção apropriada apenas em 1986 e 1987, depois que o DENV-1 foi introduzido no Rio de Janeiro (RJ) (Schatzmayr *et al.* 1986), onde provocou uma epidemia de grande magnitude. O DENV-1 também foi responsável por epidemias nos estados de Ceará (CE) e Alagoas (AL) em 1986 e no estado de Pernambuco (PE) em 1987 (Barreto & Teixeira 2008).

Nos anos seguintes, a doença se tornou um problema de saúde pública em quase todo território nacional (Nogueira *et al.* 2007). Uma nova situação epidemiológica se apresentava no país, uma vez que o RJ era uma cidade portuária, um centro urbano com fluxo intenso de pessoas. Esses fatores, associados ao deficitário programa de controle do vetor, contribuíram para a disseminação da dengue para outros estados. Com epidemias que atingiram AL, Sergipe (SE) e CE, São Paulo (SP), Mato Grosso (MT), Goiás (GO), a dengue passou a ser considerada endêmica no Brasil (Figueiredo *et al.* 1991, Barbosa da Silva *et al.* 2002, Maciel *et al.* 2008).

Em 1990, em Niterói, no RJ, foi registrada a introdução do DENV-2 (FIGURA 3) (Nogueira *et al.* 1990). A cocirculação de dois sorotipos agravou a situação epidemiológica vivida pelo país, provocando um aumento dos números de casos registrados e elevando a incidência de dengue, bem como causando um agravamento dos quadros clínicos, sendo notificados os primeiros casos de Febre Hemorrágica do Dengue/ Síndrome do Choque do

Dengue (FHD/SCD) no país (Nogueira *et al.* 2007). Naquele ano, foram notificados 40.279 casos, com 274 casos de FHD e oito óbitos. Na década de 90, foram observadas outras epidemias no país, especialmente na região nordeste (Dégallier *et al.* 1996).

A introdução do DENV-3, que foi isolado em Nova Iguaçu, no RJ (Nogueira *et al.*, 2000), e em RR em 2001 e em 2002 respectivamente, resultou na cocirculação dos três sorotipos (DENV-1, DENV-2 e DENV-3). Nesta ocasião, o Brasil registrou no ano de 2002, uma de suas maiores epidemias até então, cerca de 800 mil casos notificados, dos quais 288.245 foram notificados no RJ (Nogueira *et al.* 2005, Maciel *et al.* 2008).

Entre 2002 e 2007, o DENV-3 foi o sorotipo predominante. Entretanto, no primeiro semestre de 2007, houve uma mudança repentina no padrão observado no Brasil, com um aumento significativo na proporção de casos de graves da doença ocorrendo na faixa etária de menores de 15 anos. Esse fenômeno pareceu ter associação com a reemergência do DENV-2. De fato, em 2008, houve uma extensa epidemia, que atingiu especialmente o RJ, onde cerca de 50% dos casos de dengue e 86% dos óbitos ocorreram em menores de 15 anos. (Teixeira *et al.* 2009). Naquele ano, 806.036 casos e 491 óbitos foram notificados (Brasil 2009).

A vigilância em relação aos sorotipos circulantes ao longo de 2009 identificou a reemergência do DENV-1 e 529.237 casos e 298 óbitos foram notificados (Brasil 2009). No ano de 2010, DENV-1 foi o sorotipo responsável por epidemia de grandes proporções no país, com mais de 1 milhão de casos e 356 óbitos confirmados.

Em 2010 foi relatada a presença do DENV-4, em um cenário aonde já havia a cocirculação dos sorotipos DENV-1 e DENV-2. O DENV-4 foi identificado inicialmente em pacientes do estado de RR, em julho de 2010. No mesmo ano este sorotipo também foi isolado no Amazonas (AM). Posteriormente, em janeiro de 2011, o DENV4 foi isolado no Pará (PA), alcançando o estado do RJ em março do mesmo ano (Nogueira & Eppinghaus 2011, Temporão *et al.* 2011).

Novas epidemias ocorreram nos anos seguintes. DENV-4 e o DENV-1 foram os sorotipos responsáveis. Em 2012, 589.581 casos e 121 óbitos foram notificados e, em 2013, foram relatados 1.452.289 casos e 235 óbitos (Brasil 2013).

Em 2014, foram reportados 591.080 casos prováveis de dengue no país. Nesse ano foram confirmados 764 casos de dengue grave (DG), 8.436 casos de dengue com sinais de alarme (DCSA) e 473 óbitos. Em 2014, houve uma maior prevalência de casos de DENV-1 (82%) seguido do DENV-4 (16,1%) (Brasil 2015a, 2017). Em 2015, também se observou prevalência semelhante: DENV-1 (93,8%) seguido do DENV-4 (5,1%). O ano de 2015 apresentou o maior número de casos notificados no país, desde 1990. Foram relatados 1.688.688 casos suspeitos de dengue no país. Foram confirmados 1.714 casos de DG e 21693 casos de DCSA e 986 óbitos (Brasil 2016a, 2017).

Em 2016, o país registrou 1.500.535 casos prováveis de dengue com 919 casos de DG e 9.153 casos de DCSA. Neste ano foram confirmados 701 óbitos. Assim como nos anos anteriores, verificou-se maior prevalência do DENV-1 (95,2%), seguido do DENV-4 (3,3%) (Brasil 2018a).

As regiões Centro-Oeste e Sudeste apresentaram as maiores taxas de incidência: No estado do Mato Grosso do Sul (MS), alvo deste estudo, a taxa de incidência em 2016 foi de 1.684,9 casos/100 mil habitantes e 44.814 casos prováveis notificados (Brasil 2017).

No ano de 2017 foram notificados 252.054 casos prováveis de dengue no país e confirmação de 271 casos de DG, 2.590 casos de DCSA e 141 óbitos (Brasil 2018a). Enquanto que em 2018, até a semana epidemiológica 15, foram registrados 90.858 casos prováveis com 32,074 casos confirmados, sendo 75 casos de DG e 781 casos de DCSA, além de 34 óbitos(Brasil 2018b).

Do ponto de vista epidemiológico, considera-se que o Brasil possui um caráter endêmico-epidêmico, com circulação autóctone dos quatro sorotipos. As emergências e reemergências de diferentes sorotipos podem desempenhar diferentes papéis na epidemiologia da doença, especialmente quando há cocirculação de muitos sorotipos (Heringer *et al.* 2015). A epidemiologia pode ser afetada ainda quando há a cocirculação de outros arbovírus, como ocorreu no Brasil a partir de 2015, quando o país passou a viver um contexto de tríplice epidemia (com a circulação dos vírus dengue, zika e chikungunya).

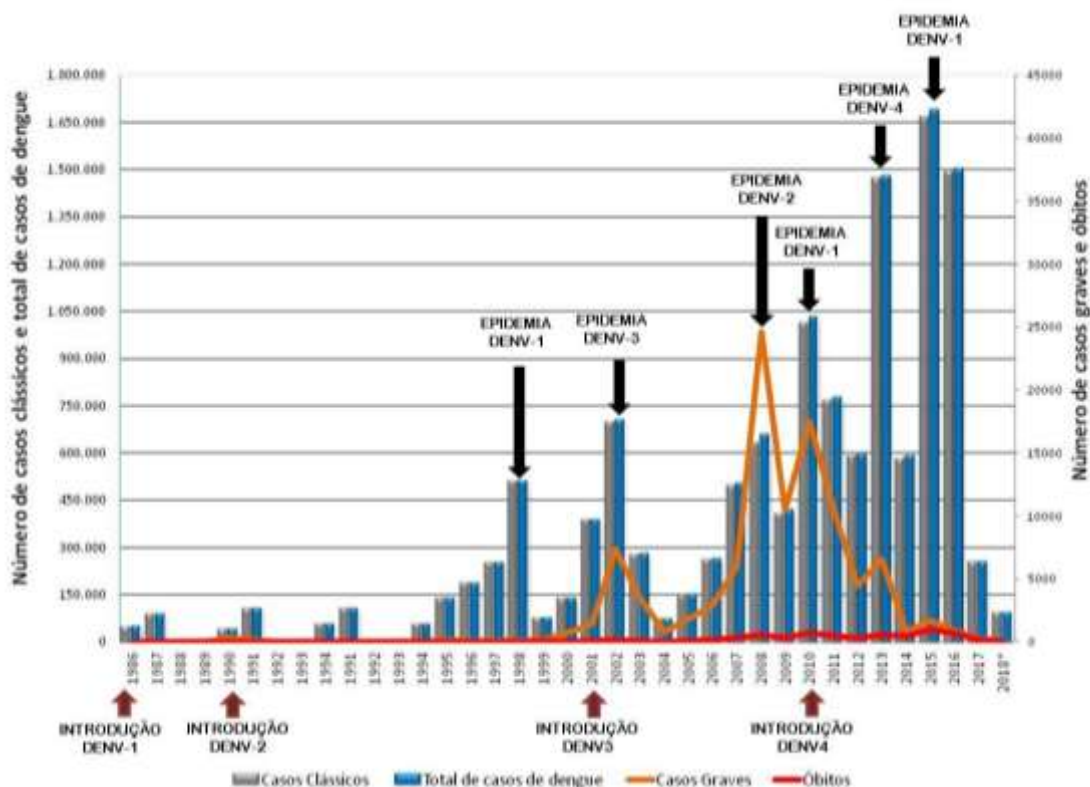


FIGURA 3: Casos de dengue, dengue grave e óbitos notificados no Brasil, 1986-2018. Dados epidemiológicos do Ministério da Saúde (SVS/MS). Adaptado de Heringer, 2017.

2.2 CICLO DE TRANSMISSÃO DO DENV

Os vírus da dengue são mantidos na natureza através de ciclos de transmissão em áreas tropicais e subtropicais por mosquitos do gênero *Aedes* (*Ae.*), destacadamente o *Ae. aegypti*, uma espécie intimamente relacionada com a habitação humana. Há dois ciclos distintos: silvestre e urbano. O ciclo silvestre tem como hospedeiros mosquitos e macacos. O ciclo de transmissão envolvendo humanos é o principal ciclo responsável por epidemias (Vasilakis & Weaver 2008).

O ciclo de transmissão começa com a infecção da fêmea adulta do mosquito, quando esta suga o sangue de um indivíduo doente, no período de viremia. Há um período de incubação extrínseco, que dura de 8 a 12 dias. Trata-se do período necessário para que ocorra a replicação e disseminação viral no vetor (Chan & Johansson 2012). Inicialmente, a replicação ocorre no intestino delgado, atinge a hemocele e a hemolinfa, ganhando acesso aos tecidos do inseto, até finalmente infectar as glândulas salivares tornando-o capaz de transmitir o vírus para um novo hospedeiro humano susceptível. (Chan & Johansson 2012, Franz *et al.* 2015). O mosquito permanece infectado durante toda sua vida e é capaz de transmitir o vírus da dengue para diversas pessoas, devido a sua capacidade de se alimentar em múltiplos indivíduos em sucessão. Os vírus também podem infectar o aparelho genital dos vetores, possibilitando a transmissão transovariana do patógeno, na qual o DENV é transmitido diretamente para a prole, dispensando o homem no ciclo mantenedor. Este modo de transmissão tem sido sugerido como um mecanismo de manutenção dos DENV nos ciclos silvestre e humano (Franz *et al.* 2015).

A transmissão do DENV ao hospedeiro humano ocorre durante o repasto sanguíneo de fêmeas de mosquito infectadas. O hospedeiro humano torna-se virêmico após um período de incubação de 3 a 14 dias pós-picada, período este que coincide com o início do período febril (Chen & Vasilakis 2011).

2.3 CÉLULAS- ALVO E REPLICAÇÃO.

Os fagócitos mononucleares, macrófagos, monócitos e as células dendríticas (DCs, *Dendritic Cells*), são considerados como principais alvos para a replicação do DENV. No entanto, através de estudos em tecidos infectados de casos fatais, já foram detectados antígenos virais em células de baço, pulmão, células endoteliais, em células perivasculares do cérebro e também em hepatócitos e células de Kupffer, fibras cardíacas e pneumócitos tipo 2 (Jessie *et al.* 2004, Póvoa *et al.* 2014).

Em modelos *in vitro*, DENV é capaz de infectar várias linhagens, a exemplo da linhagem C6/36 proveniente do clone do mosquito *Ae. albopictus*, de células VERO (células renais de macaco verde africano - *Cercopithecus aethiops*), HepG2 e Huh7 (linhagem de hepatócitos) (Marianneau *et al.* 1996, Lin *et al.* 2000), EA.hy926 (células endoteliais humanas) (Kanlaya *et al.* 2009), HUVEC (células endoteliais da veia umbilical humana), HMVEC (Células endoteliais da microvasculatura humana (Kelley *et al.* 2012) e HMEC-1 (células endoteliais da microvasculatura dermal humana) (Talavera *et al.* 2004).

Conforme mencionado anteriormente, a infecção se inicia com a picada da fêmea do mosquito na pele, que ao se alimentar, libera vírus no sangue do indivíduo. Uma vez dentro do organismo, postula-se que o DENV adentra suas células alvo, por endocitose mediada pela ligação com diferentes receptores de membrana, que estão naturalmente presentes nestas células. Apesar dos esforços para determinar a(s) molécula(s) responsável(eis) para reconhecimento de DENV pelas células alvo, um receptor específico para DENV ainda não foi definitivamente identificado (Hidari & Suzuki 2011). No entanto, vários candidatos de natureza distinta, presentes em células de mamíferos surgiram, a exemplo de glicosaminoglicanos, como o heparan sulfato, a molécula de adesão das células dendríticas (DC-SIGN, *dendritic cell ICAM-3 grabbing non integrin*), o receptor de manose, e o receptor CD14, presente em monócitos e macrófagos (Cruz-Oliveira *et al.* 2015).

Após a endocitose, já no citoplasma celular, a acidificação do endossoma resulta em alterações na estrutura da proteína e, exposição do domínio de fusão, permitindo a liberação de nucleocapsídeo no citoplasma. O RNA viral é liberado no citoplasma e apresentado ao retículo endoplasmático rugoso (RER). O RNA viral é traduzido em uma única poliproteína que é processado por proteases virais e do hospedeiro (Screaton *et al.* 2015). A proteína NS1 é inicialmente expressa em associação com o RER; o monômero é modificado pela adição de moléculas de carboidratos ricos em manose (CHO), resultando em associação com a membrana. Um subconjunto de NS1 do vírus da dengue adquire glicosil-fosfatidilinositol (GPI). Tanto a NS1 ligada à membrana como a NS1 ancorada à GPI são transportadas para a superfície celular através de uma via desconhecida, onde se demonstrou que as proteínas se associam com lipídios, como o colesterol. As proteínas NS1 associadas à superfície celular podem ser secretadas pelas células hospedeiras (Guzman *et al.* 2016).

Após o complexo de replicação viral ser sintetizado, a síntese de RNA começa com a transcrição de um RNA viral anti-sentido seguido pela amplificação do RNA viral. O RNA recém-sintetizado é posteriormente embalado pela proteína capsidial formando um nucleocapsídeo.

Após ciclos de tradução sucessivos, ocorre a montagem da partícula viral no retículo endoplasmático (RE), ocorre a maturação do vírion no complexo de Golgi e a partícula viral é então liberada das células via exocitose (Screaton *et al.* 2015, Guzman *et al.* 2016). A FIGURA 4 mostra o processo em detalhes.

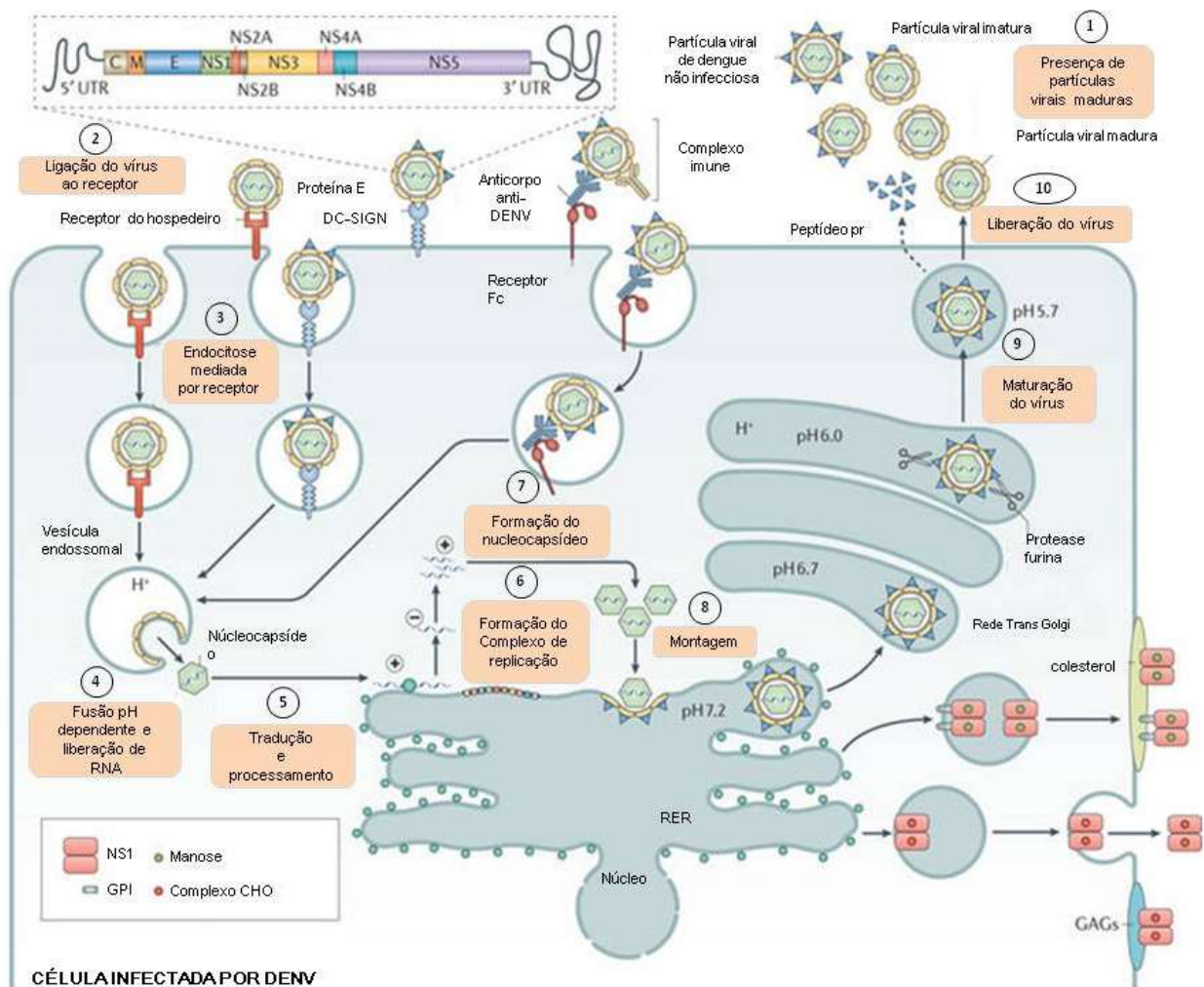


FIGURA 4: Ciclo de replicação do vírus dengue. (1) O processo de replicação viral começa quando as partículas virais maduras se direcionam para um grupo diversificado de receptores celulares ou para a porção Fc de um complexo imune viral e liga-se ao receptor nas células-alvo (2), adentrando a célula alvo, através de endocitose mediada por receptor (3). A acidificação do endossoma resulta em alterações na estrutura da proteína E, expondo o domínio de fusão, resultando na liberação do nucleocapsídeo no citoplasma(4). Assim, o RNA viral é liberado no citoplasma e traduzido nas membranas do RER em uma única poliproteína. A seguir é processado por proteases virais e hospedeiras, dando origem a três proteínas estruturais e sete não estruturais (5). Após a síntese do complexo de replicação viral(6), a tradução do RNA se encerra e inicia a síntese de RNA viral. O RNA recém sintetizado é posteriormente embalado pela proteína capsidial formando um nucleocapsídeo (7). Após ciclos de tradução sucessivos, ocorre a montagem da partícula viral no RE (8), maturação do vírion no complexo de Golgi e a partícula viral é então liberada das células via exocitose (9). Fonte: (Adaptado de Screaton *et al.* 2015, Guzman *et al.* 2016)

2.1 CLASSIFICAÇÃO DAS FORMAS CLÍNICAS DA DENGUE

A dengue manifesta-se comumente como uma doença aguda, podendo ocorrer tanto nas infecções primárias, quanto nas secundárias, e afetar crianças e adultos. Cada sorotipo do DENV é capaz de causar um amplo espectro de manifestações clínicas. A doença pode se apresentar como uma infecção assintomática, como uma febre indiferenciada, com manifestações brandas (febre, cefaleia, artralgia, mialgia e prurido) ou manifestações clínicas graves caracterizadas por extravasamento plasmático e/ou hemorragia, podendo evoluir para o choque (Srikiatkhachorn & Green 2010).

Historicamente, a dengue foi considerada uma doença debilitante, mas não fatal. Durante o final da década de 1960, surtos de febre hemorrágica fatal decorrentes de infecção por dengue, em crianças, no Sudeste Asiático, mudaram essa percepção (Srikiatkhachorn *et al.* 2011). As informações clínicas desses surtos constituíram a base para uma classificação clínica da dengue publicada na diretriz da Organização Mundial da Saúde (OMS) em 1975 e atualizada em 1997 (Phuong *et al.* 2004, Balmaseda *et al.* 2005, Bandyopadhyay *et al.* 2006, Rigau-Pérez 2006, Deen *et al.* 2006, Srikiatkhachorn *et al.* 2011).

Nesta diretriz, as infecções pelo DENV foram agrupadas em categorias de acordo com quadro clínico dos pacientes: Febre do Dengue (FD) e Febre Hemorrágica do Dengue (FHD) (FIGURA 5). A FHD era subdividida em quatro graus de gravidade, sendo os graus III e IV definidos como Síndrome do choque da dengue (SCD).

A febre da dengue é então definida como uma doença com pelo menos dois achados clínicos, incluindo náuseas, vômitos, dor de cabeça, artralgia, dor retro-orbital, erupção cutânea, mialgia, manifestações hemorrágicas e leucopenia. Devido à falta de especificidade desses sinais e sintomas clínicos, se fazia necessária evidência laboratorial ou epidemiológica de infecção do vírus da dengue para um diagnóstico confirmado.

Nesta classificação, a definição de FHD consiste em 4 critérios clínicos: febre, tendência hemorrágica (hemorragia espontânea ou resultado positivo do teste de torniquete), trombocitopenia (contagem de plaquetas, ≥ 100000 células/mm³) e extravasamento plasmático como mostrado pelo derrame pleural, ascite ou $\geq 20\%$ de hemoconcentração.

Várias críticas foram levantadas contra a definição de casos FHD apresentada pela OMS, 1997. Os relatórios argumentaram que a definição de caso de FHD era muito rígida e muito difícil para aplicação nos cuidados primários ou em sistemas de saúde com recursos limitados (Phuong *et al.* 2004, Balmaseda *et al.* 2005, Bandyopadhyay *et al.* 2006, Rigau-Pérez 2006, Deen *et al.* 2006, Srikiatkhachorn *et al.* 2011). Outra crítica foi que a definição do caso não identifica uma proporção significativa de casos graves de dengue. Por exemplo, manifestações graves, como encefalopatia e insuficiência hepática, não estão incluídas na

definição do caso FHD. Além disso, foi questionado se as definições de caso, que foram desenvolvidas com base em dados de casos pediátricos no sudeste da Ásia, seriam aplicáveis a outras regiões e populações, como por exemplo, países da América Latina. Conseqüentemente, um estudo multicêntrico chamado *Dengue Control* (DENCO) foi realizado. Com base em seus achados, uma nova classificação clínica da dengue foi publicada na diretriz mais recente da OMS e posteriormente promulgada (WHO 2009). Com os novos critérios de classificação, a doença classifica-se em: Dengue com Sinais de Alarme (DCSA), Dengue sem Sinais de Alarme (DSSA) ou Dengue Grave (DG), conforme ilustrado na FIGURA 5:



FIGURA 5: Classificação da Dengue quanto à gravidade clínica, de acordo com WHO 2009. Adaptado de (Guzman et al. 2016)

2.2 ESPECTRO CLÍNICO DA DENGUE

Pacientes com dengue podem progredir através de três fases clínicas conhecidas como fase febril, fase crítica e fase de recuperação (Brasil 2016b) (FIGURA 6).

2.2.1 FASE FEBRIL

Os pacientes geralmente desenvolvem febre alta, de aparecimento abrupto, que pode ser bifásica. Esta fase febril aguda geralmente dura de 2 a 7 dias, é frequentemente acompanhada por rubor facial, eritemas na pele, dor generalizada no corpo, mialgia, artralgia, cefaleia e dor retro-orbital (Bhatt *et al.* 2013, PAHO 2016). Alguns pacientes podem apresentar odinofagia, e hiperemia faríngea e conjuntival. Sintomas gastrointestinais (anorexia, náuseas, vômitos e diarreia) são comuns. Na fase febril adiantada pode ser difícil diferenciar clinicamente a dengue de outras doenças febris agudas (Campagna *et al.* 2006, PAHO 2016). No entanto, a prova do laço positiva aponta maior probabilidade do paciente ter dengue, embora este teste seja considerado inespecífico. Estima-se que aproximadamente 21% dos casos com prova do laço positiva não sejam confirmados como tal (Kalayanarooj *et al.* 1997, Phuong *et al.* 2002, PAHO 2016).

No início do estágio febril, as características clínicas são indistinguíveis entre casos de dengue e aqueles que mais tarde poderão tornar-se dengue grave (Phuong *et al.* 2002, Bandyopadhyay *et al.* 2006, PAHO 2016). Portanto, o monitoramento de sinais de alerta, bem como demais parâmetros clínicos é crucial para reconhecer a progressão para a fase crítica. Manifestações hemorrágicas leves como petéquias e equimoses na pele podem ser vistos alguns dias após o início da doença. O fígado pode apresentar hipertrofia e sensibilidade após alguns dias de febre (Rigau-Pérez *et al.* 1998, WHO 2009, PAHO 2016). Pode ocorrer diminuição progressiva da contagem total de leucócitos (Kalayanarooj *et al.* 1997, Srichaikul & Nimmannitya 2000, PAHO 2016).

2.2.2 FASE CRÍTICA (DEFERVESCÊNCIA)

Na fase crítica ou de defervescência, a temperatura do corpo pode cair e permanecer, em média, 37,5°C ou menos (FIGURA 6). Do 3º ao 7º dia de doença, pode ser observado em alguns pacientes um aumento na permeabilidade vascular bem como aumento nos níveis de hematócrito. Isso marca o início da fase crítica; ou seja, a fase de manifestações clínicas com extravasamento plasmático significativo, que geralmente dura de 24 a 48 horas e pode estar associada à epistaxe (sangramento da mucosa nasal) e gengivorragia (sangramento das gengivas), bem como metrorragia ou hipermenorréia (sangramento transvaginal em mulheres de idade fértil) (Srikiatkachorn *et al.* 2007, PAHO 2016). Além disso, leucopenia com neutropenia e linfocitose com 15 a 20% de formas atípicas, seguido por uma rápida diminuição da contagem de plaquetas, geralmente precede o extravasamento de plasma (Kalayanarooj *et al.* 1997, PAHO 2016). Pacientes que apresentam aumento de permeabilidade vascular podem ter seu quadro agravado como

resultado da perda de volume de plasma e podem apresentar sinais de alerta. Se a volemia não for prontamente e devidamente restaurada, esses pacientes tendem a apresentar sinais de hipoperfusão tecidual e choque hipovolêmico. Derrame pleural e ascite podem ser clinicamente detectáveis, dependendo do grau de extravasamento de plasma e do volume de fluidos administrados. Raio-X do tórax, ultrassom abdominal, ou ambos, são ferramentas úteis para o diagnóstico precoce de efusões da cavidade serosa, bem como o espessamento da parede da vesícula biliar (Colbert *et al.* 2007, PAHO 2016).

O choque hipovolêmico ocorre quando um volume crítico de plasma é perdido durante o extravasamento e é quase sempre precedido de sinais de alarme. Se este quadro permanecer por tempo prolongado, o aporte reduzido de sangue para os tecidos resulta no comprometimento progressivo dos órgãos, acidose metabólica e coagulação intravascular disseminada. Isto leva a hemorragia grave com conseqüente aumento do hematócrito. Ao invés de leucopenia, usualmente vista nessa fase, a contagem de leucócitos totais pode aumentar em pacientes com sangramento grave. No entanto, o comprometimento grave dos órgãos, como hepatite, encefalite e miocardite e até mesmo hemorragias graves podem se desenvolver sem extravasamento plasmático ou choque hipovolêmico aparentes (WHO 2009).

Alguns indivíduos podem evoluir para a Dengue Grave, que é definida por um ou mais dos seguintes sintomas: (i) extravasamento plasmático, que pode levar ao choque e/ou acúmulo de fluidos em compartimentos extravasculares; (ii) hemorragia grave; (iii) comprometimento dos órgãos (FIGURA 5). Conforme a permeabilidade vascular progride, a hipovolemia agrava e resulta no choque. Durante o estágio inicial, o mecanismo compensatório que mantém a pressão sanguínea sistólica em níveis normais induz taquicardia e vasoconstrição periférica com perfusão sanguínea diminuída nas extremidades. Por fim, ocorre uma descompensação nas pressões sistólica e diastólica, que caem drasticamente e este quadro de hipotensão e hipóxia, quando prolongado, resulta em falência múltipla de órgãos. Ainda, pacientes graves podem apresentar alterações nos fatores de coagulação sanguínea, embora essas alterações não estejam relacionadas com hemorragias graves. Quando o quadro hemorrágico grave ocorre, quase sempre é acompanhado de choque hipovolêmico. Este quadro, em combinação com a trombocitopenia, hipóxia e acidose, pode levar a falência múltipla de órgãos e coagulação intravascular disseminada. Algumas manifestações incomuns podem ocorrer, incluindo insuficiência hepática aguda e encefalopatias, que acontecem mesmo na ausência de extravasamento plasmático e choque. Cardiomiopatias e encefalite também já foram detectadas. No entanto, a maior parte das mortes por dengue ocorre em pacientes com choque profundo, particularmente se houver sobrecarga de líquidos (WHO 2009)

2.2.3 FASE DE RECUPERAÇÃO (CONVALESCENTE)

Na fase de recuperação há uma reabsorção gradual do fluido do extravascular para o compartimento intravascular. Este período de reabsorção pode durar de 48 a 72 horas (FIGURA 6). Normalmente, o bem-estar geral melhora, há recuperação do apetite, sintomas gastrointestinais tendem a diminuir, o estado hemodinâmico se estabiliza. Alguns pacientes podem apresentar erupção cutânea acompanhada de prurido generalizado (Kautner *et al.* 1997, Phillips *et al.* 2009, PAHO 2016), bradicardia sinusal e alterações eletrocardiográficas (Lateef *et al.* 2007, PAHO 2016).

O hematócrito estabiliza-se ou pode ser menor devido ao efeito de diluição do fluido reabsorvido. Geralmente, a contagem de leucócitos começa a aumentar com o aumento dos neutrófilos e a queda nos linfócitos (Oliveira *et al.* 2009, PAHO 2016). A contagem de plaquetas tende a aumentar rapidamente na fase de recuperação.

Problemas respiratórios devido ao derrame pleural e ascite maciça podem ocorrer a qualquer momento durante a fase crítica ou de recuperação, geralmente em decorrência da administração intravenosa rápida ou excessiva de fluidos.

Esse fenômeno também pode ocorrer em pacientes com alterações renais, miocárdicas, pulmonares ou naqueles com nefropatia prévia ou miocardiopatia representando a principal causa de insuficiência cardíaca congestiva, edema pulmonar ou ambos (Phillips *et al.* 2009, PAHO 2016).

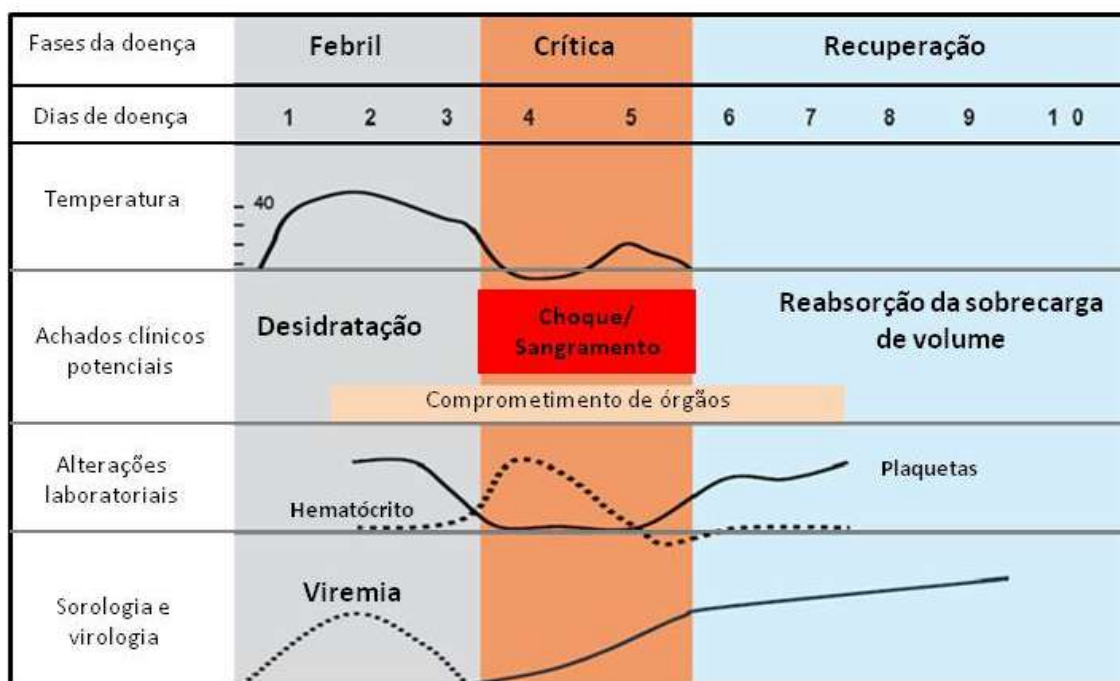


FIGURA 6: Fases de evolução da dengue. Curso das alterações clínicas e laboratoriais após início dos sintomas (WHO, 2009)

2.3 PATOGÊNESE

Acredita-se que a patogênese seja o resultado de uma interação de fatores do hospedeiro, virais e ambientais. Os mecanismos pelos quais a infecção por DENV gera os quadros mais graves ainda são bastante discutidos na literatura e uma série de teorias foram formuladas. A seguir, estas serão discutidas brevemente.

2.3.1 FACILITAÇÃO DA INFECÇÃO DEPENDENTE DE ANTICORPOS

A teoria da Facilitação da infecção dependente de Anticorpos (*Antibody Dependent Enhancement* - ADE) envolvida na gravidade da dengue foi proposta por Halstead e O'Rourke em 1977.

Acredita-se que a imunidade homotípica seja longa, mas após um breve período de proteção cruzada, as infecções heterotípicas ocorrem e são acompanhadas de respostas de anticorpos originários de infecções secundárias (Halstead & O'Rourke 1977). Esta teoria propõe que o vírus opsonizado por anticorpos subneutralizantes sofra maior interiorização nos macrófagos, levando a uma maior replicação viral e ativação destas células com aumento da liberação de fatores inflamatórios (Clyde *et al.* 2006). Por esse prisma, a ocorrência de casos graves está associada a pelo menos duas infecções sequenciais por sorotipos distintos.

Em uma segunda infecção, são produzidos dois tipos de anticorpos: os neutralizantes e os subneutralizantes com reatividade cruzada a sorotipos distintos. Nesta ocasião os anticorpos produzidos conjuntamente (de reatividade cruzada/ subneutralizantes) podem se ligar à partícula do vírus da infecção em andamento, formando um complexo antígeno-anticorpo. Este complexo tem acesso facilitado aos receptores expressos nas células-alvo, ajudando o vírus a infectar as células de forma mais eficiente, e levando conseqüentemente, a um aumento da replicação e da carga viral (FIGURA 7).

Esses eventos provocariam uma produção exagerada de mediadores inflamatórios contribuindo para o desenvolvimento da forma grave de dengue.

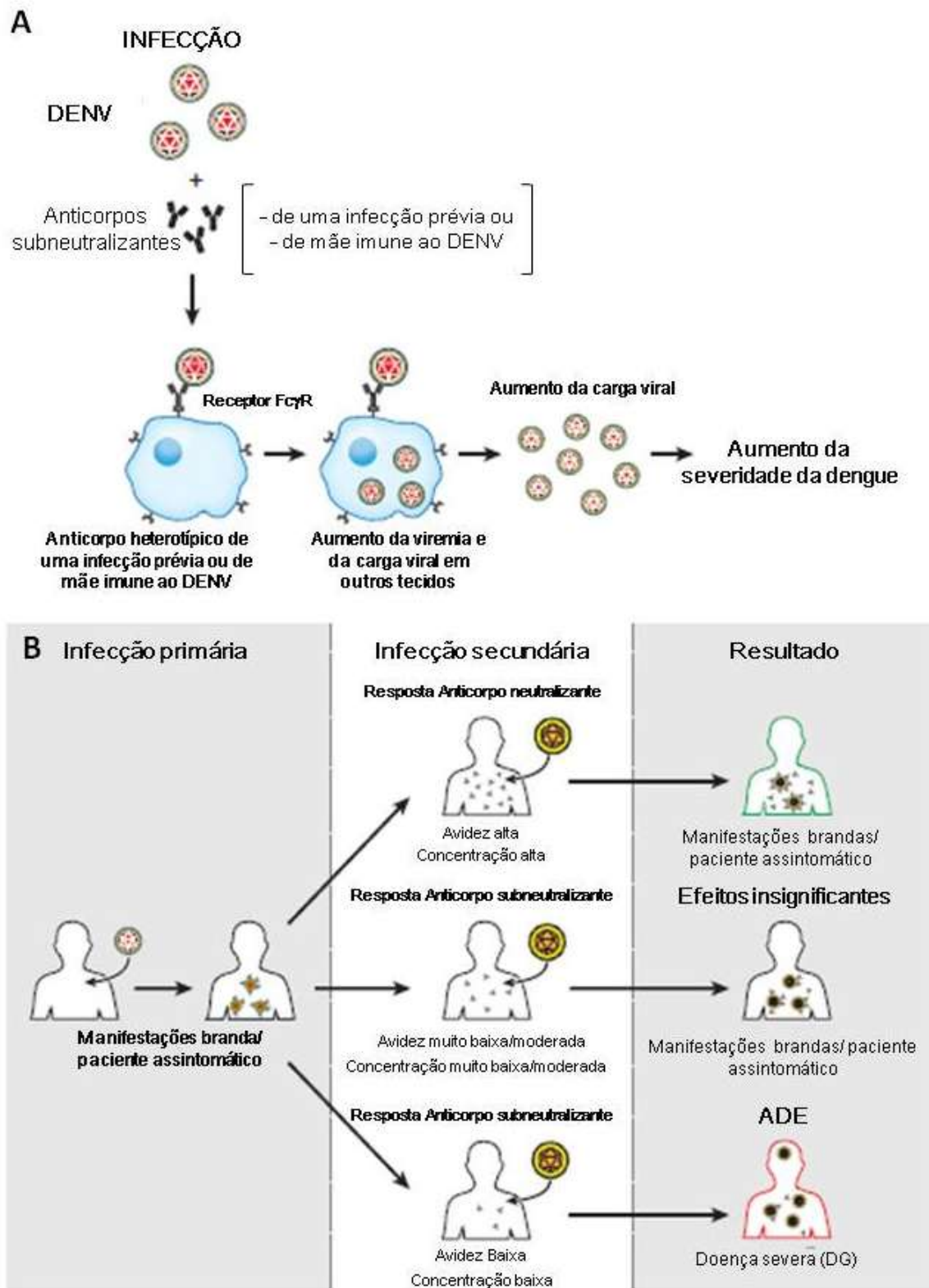


FIGURA 7: Modelo de ADE para a infecção por dengue. (A) O aumento da replicação do vírus ocorre quando anticorpo não neutralizante presente no hospedeiro devido a uma infecção primária pelo vírus da dengue (DENV) se liga a uma partícula infectante de DENV durante uma infecção heterotípica subsequente, mas sem neutralizar o vírus. Em vez disso, o complexo vírus-anticorpo se liga aos receptores Fcγ (FcγR) nos monócitos circulantes, facilitando a infecção dessas células. O resultado geral é um aumento na replicação global do vírus, levando ao potencial para doença mais grave. (B) três categorias de resultados clínicos são possíveis. Se a avidéz e a concentração dos anticorpos forem altas, a segunda infecção é neutralizada sem causar sintomas. Se a avidéz e a concentração dos anticorpos forem moderadas ou mínimas, a infecção pelo vírus é controlada por outros mecanismos e os anticorpos têm efeitos insignificantes. Se a avidéz e a concentração dos anticorpos forem baixas, então os anticorpos aumentam a infecção e resultam em doença grave.

Fonte: Adaptado de (Elong Ngono & Shresta 2018)

2.3.2 PECADO ANTIGÊNICO ORIGINAL

A teoria do pecado antigênico original sugere que a gravidade observada durante infecções secundárias ocorre devido à participação dos linfócitos T específicos para o DENV (Mongkolsapaya *et al.* 2003). Desta forma, durante uma infecção primária ocorre expansão de clones de células T específicas para o sorotipo infectante e geração de células de memória específicas. Assim, os linfócitos T específicos reagem contra os vírus, levando a sua eliminação. Em uma segunda infecção por outro sorotipo, as células T de memória geradas na primeira infecção, específicas somente para o sorotipo anterior, reagiriam de forma cruzada contra o vírus da infecção atual, uma vez que compartilham muitos epítomos em comum. No entanto, essas células apresentam baixa afinidade, citotoxicidade reduzida e menor capacidade de produção de citocinas antivirais e não são eficientes na eliminação do vírus. Ao contrário, produzem exagerada quantidade de mediadores inflamatórios, favorecendo o aumento da permeabilidade vascular, que dentre outras consequências, levaria a uma ativação constante e desregulada do endotélio com o aumento da permeabilidade vascular. Isto poderia culminar em hemorragias graves, choque e até morte do paciente (FIGURA 8) (Mangada & Rothman 2005, Mongkolsapaya *et al.* 2006, Remy 2014).

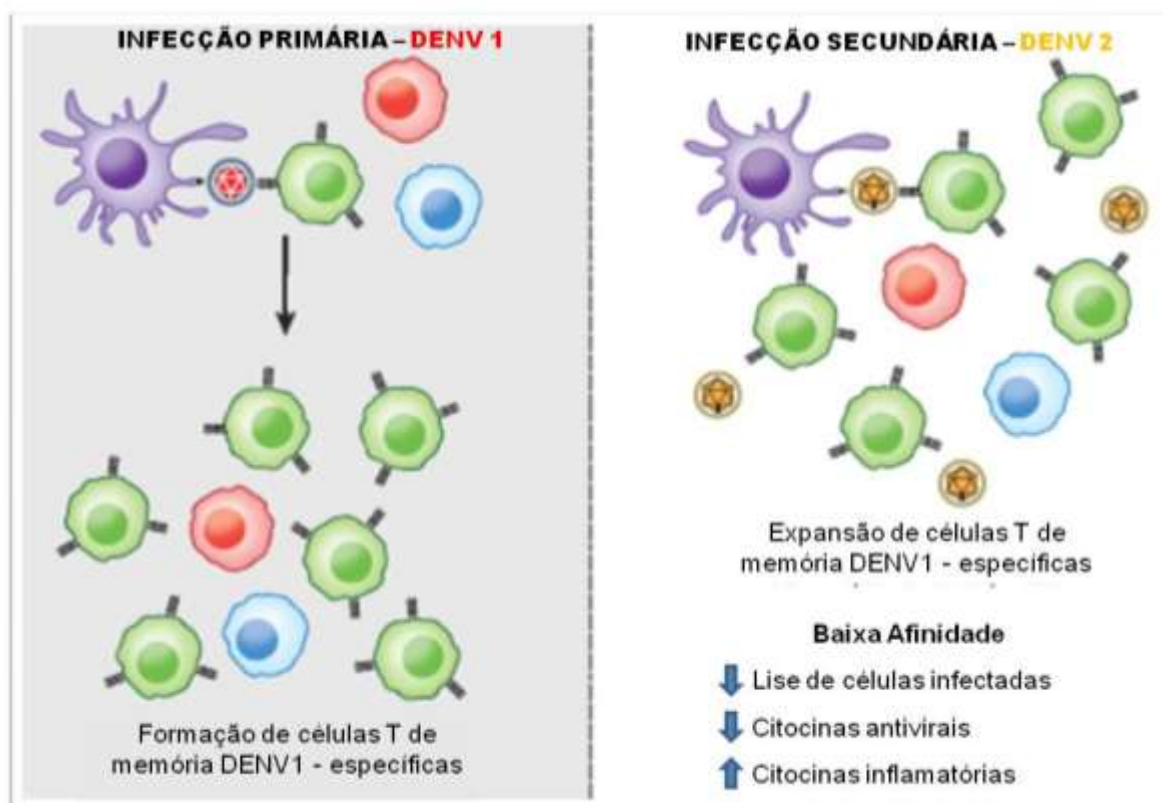


FIGURA 8: Ilustração do fenômeno do pecado original antigênico em dengue. As células T de reatividade cruzada geradas durante uma infecção primária poderiam prevalecer durante uma infecção secundária. Havendo uma alta proporção de células T reativas de baixa afinidade, mas ainda assim desencadeando a produção de citocinas inflamatórias sem citotoxicidade, isso pode predispor à imunopatologia. Fonte: Adaptado de (Elong Ngonu & Shrestha 2018)

2.3.3 “TEMPESTADE” DE CITOCINAS E EXTRAVASAMENTO VASCULAR

Foi sugerido que as formas de dengue grave se manifestam no contexto da produção exacerbada de citocinas pró-inflamatórias – a chamada “tempestade de citocinas” - que, em última instância, atinge o endotélio vascular e, eventualmente, leva a aumento transitório da permeabilidade vascular, manifestações hemorrágicas, hemoconcentração e, em alguns casos, desenvolvimento de choque hipovolêmico intratável, resultando em morte (Basu Atanu & Chaturvedi Umesh C. 2008, Rothman 2011, Costa *et al.* 2013).

Assim, parece que a inflamação excessiva contribui para a patogênese da enfermidade e esse evento seria, portanto, característico das formas graves da doença, onde uma infecção secundária por um sorotipo diferente seria marcadamente um fator de risco (Malavige & Ogg 2012). Embora níveis elevados de citocinas pró-inflamatórias e quimiocinas ocorram em pacientes com dengue brando, níveis mais altos destes mediadores são observados em pacientes com dengue grave (Azeredo *et al.* 2001, Chen *et al.* 2006a, Lee *et al.* 2006, Bozza *et al.* 2008).

A ativação de linfócitos T, células *Natural Killer* (NK), monócitos, macrófagos, bem como de células dendríticas, levam ao aumento da produção de citocinas e quimiocinas. Estes mediadores atuam em diversos tecidos, inclusive no endotélio vascular, contribuindo para o aumento da permeabilidade vascular e extravasamento plasmático (Pang *et al.* 2006, John *et al.* 2015).

Por exemplo, níveis aumentados de TNF- α , IL-6, IL-8, IL-10, CCL2/MCP1, CCL3, MIF, IP10/CXCL10 e IFN- γ foram relatados em pacientes com DG (Azeredo *et al.* 2001, Braga *et al.* 2001, Lee *et al.* 2006, Chen *et al.* 2006b, Bozza *et al.* 2008, Butthep *et al.* 2012, Pinto *et al.* 2012b, Costa *et al.* 2012, Ferreira *et al.* 2015). Muitas destas citocinas já foram associadas à gravidade da doença, incluindo disfunção hepática, hipotensão, trombocitopenia e choque hemorrágico (Rothman 2011, Azeredo *et al.* 2015, Ferreira *et al.* 2015)

Ainda não se compreende claramente como esta produção maciça de citocinas é induzida e eventualmente controlada. No entanto, alguns trabalhos sugerem que na dengue grave ocorra uma ativação desregulada das células imunes, no aumento da produção de mediadores pró-inflamatórios e consequente disfunção das células endoteliais desencadeada pelo vírus e em vários mecanismos imunopatológicos. (Cardier *et al.* 2005, John *et al.* 2015)

2.3.4 VIRULÊNCIA VIRAL

De acordo com essa teoria, a gravidade de dengue estaria associada à fatores virais que incluem tanto o sorotipo infeccioso quanto o genótipo do vírus, com certos genótipos dentro de cada sorotipo sendo mais virulentos que os demais (Leitmeyer *et al.* 1999, Yacoub *et al.* 2016). Por esse prisma, as variações genéticas e antigênicas, bem como à carga viral teriam implicações na virulência viral (Libraty *et al.* 2002).

Por meio de pesquisas na área de epidemiologia de base populacional, alguns genótipos têm sido relacionados com a maior incidência de formas graves de dengue, a exemplo do DENV-2 cepa Sudeste asiático, em comparação com o DENV-2 cepa americana (Watts *et al.* 1999).

Os dados obtidos por Sangkawibha e colaboradores (1984) em estudo prospectivo da epidemia de 1980 na Tailândia, sugerem que a sequência específica de sorotipos associados às infecções primária e secundárias poderiam determinar maior ou menor risco para o desenvolvimento de SCD. Assim, uma infecção por DENV-1 seguida de uma infecção secundária por DENV-2 seria relativamente mais virulenta (Sangkawibha *et al.* 1984). Em outro estudo, o DENV-2 também foi mais frequente relacionado com casos de FHD grau I quando comparado com DENV-1 (Fried *et al.* 2010).

Fried e colaboradores (2010) também observaram que DENV-2 e DENV-3 têm sido associados à dengue grave, enquanto que DENV-1 e 4 são mais frequentemente relacionados com manifestações brandas da doença (Revisto por Paiva 2016).

No Brasil, a introdução de uma nova linhagem de DENV-2 foi relacionada com maior número de casos graves e fatais (Faria *et al.* 2013, Nunes *et al.* 2016b). Além disso, estudos recentes demonstram que a emergência do DENV-4 no Brasil não foi associada a casos mais graves mesmo em indivíduos apresentando infecção secundária (Faria 2016, Heringer *et al.* 2017).

3. ZIKA

A febre Zika é uma doença de etiologia viral transmitida principalmente pelos mosquitos *Ae. aegypti* e *Ae. albopictus*. O vírus zika (ZIKV) pertence ao gênero *Flavivirus* e à família *Flaviviridae*. Estudos baseados na proteína NS5 descreveram a existência de duas principais linhagens de ZIKV: Africana e Asiática (Haddow *et al.* 2012). O ZIKV está intimamente relacionado com outros flavivírus de importância médica tais como o DENV e YF (Thomas *et al.* 2014). A infecção pelo ZIKV pode causar uma infecção inaparente em muitos indivíduos. Os indivíduos que desenvolvem sintomas, geralmente apresentam uma doença branda e autolimitada, semelhante a dengue. Embora a doença seja branda na maior parte dos pacientes, estudos demonstraram a associação causal entre a infecção pelo ZIKV e microcefalia em recém-nascidos de mães infectadas, assim como com o desenvolvimento de complicações neurológicas e síndrome de Guillain-Barré (SGB) (Chang *et al.* 2016). O recente surto epidêmico no Brasil e em outros países da América Latina ilustrou a rapidez com que o ZIKV emergiu (Zanluca *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015).

3.1 HISTÓRICO E EPIDEMIOLOGIA

O ZIKV foi originalmente isolado em 1947 em macacos *Rhesus*, durante um estudo que os utilizava como sentinelas para detecção de febre amarela, na floresta Zika localizada na península de Entebbe, antiga capital da República de Uganda (Dick *et al.* 1952). Subsequentemente o ZIKV foi isolado a partir de mosquitos *A. africanus* no mesmo local (Dick 1952). O novo microorganismo identificado foi denominado de Zika vírus, em referência ao nome da floresta.

O ZIKV também foi isolado de outras espécies de mosquitos do gênero *Aedes*, incluindo *Ae. aegypti* na Malásia nas décadas subsequentes (Lanciotti *et al.* 2008). Muitas outras espécies de *Aedes*, tais como *Ae. luteocephalus*, *Ae. albopictus*, *Ae. furcifer*, *Ae. vittatus*, *Ae. taylori*, *Ae. dalzielii*, *Ae. hirsutus*, *Ae. metallicus*, *Ae. hensilli* e *Ae. unilineatus* também foram implicados como vetores, assim como mosquitos de outros gêneros, incluindo *Culex quinquefasciatus* (Ayres 2016), apesar deste dado necessitar de mais evidências para comprovações do real papel deste último vetor na transmissão do vírus.

A primeira evidência de infecção humana pelo ZIKV ocorreu em 1952, quando Smithburn demonstrou a presença de anticorpos neutralizantes em soros humanos coletados na África Ocidental (Smithburn 1952). Casos esporádicos e evidência sorológica foram reportados em estudos e relato de caso demonstrando a presença do ZIKV em várias regiões da África e Ásia antes de se espalhar para a região do Pacífico e mais recentemente para as Américas. Em 1954, a vigilância sorológica na África Equatorial Francesa demonstrou a presença de 0,5% de anticorpos anti-ZIKV (Pellissier 1954).

Foram detectados casos isolados em países da África e, no final da década de 1970, na Indonésia. Trinta e oito por cento (38%) dos indivíduos apresentaram anticorpos

neutralizantes na Nigéria no período de 1971-1975 (Fagbami 1979). Nos anos 1977-1978, a doença também foi confirmada através da presença de anticorpos anti-ZIKV em pacientes na Indonésia (Olson *et al.* 1981).

Não foram localizadas publicações com relatos de casos de zika no período de 1983-2006. O surgimento do surto na ilha Yap nos Estados Federados da Micronésia, na Oceania, em 2007, foram os primeiros casos de infecção pelo ZIKV fora da África e da Ásia (Duffy *et al.* 2009).

Entre 2008-2013 foram relatados casos de infecção pelo ZIKV no Senegal, África e no Camboja, Sudeste Asiático. Em um dos estudos, dois pesquisadores adquiriram a infecção no Senegal e retornaram às suas residências no Colorado e um destes transmitiu a doença a esposa (Heang *et al.* 2011, Foy *et al.* 2011). Outro surto foi documentado entre outubro de 2013 e fevereiro de 2014, na Polinésia Francesa. Durante o ano de 2014, o ZIKV espalhou-se por toda a Oceania com casos relatados em Nova Caledônia, Ilha Cook e Ilha de Páscoa (Ioos *et al.* 2014, Tognarelli *et al.* 2016), provavelmente relacionados com o surto na Micronésia (Musso *et al.* 2014b).

Em 2015, foi confirmada a circulação do vírus no Nordeste do Brasil, quando pesquisadores da Universidade Federal da Bahia detectaram o genoma do vírus Zika em 7 de 24 amostras sorológicas de fase aguda de pacientes exantemáticos de Camaçari, Bahia (BA), através da reação em cadeia da polimerase (RT-PCR) (Campos *et al.* 2015). A transmissão autóctone no Brasil também foi posteriormente confirmada por Zanluca e colaboradores do Laboratório de Virologia Molecular do Instituto Carlos Chagas, Instituto Oswaldo Cruz, no Paraná (PR), em amostras provenientes do Rio Grande do Norte (RN), onde encontraram 8 amostras positivas, testadas por RT-PCR. A análise filogenética demonstrou uma alta identidade com sequências da linhagem asiática do ZIKV (Zanluca *et al.* 2015).

Os estados do RJ (Brasil *et al.* 2016a), AL, MA e PA (Vasconcelos 2015) também confirmaram a presença do ZIKV em amostras analisadas. A partir de então, a disseminação se deu de forma rápida e no final do ano de 2015, 19 unidades da federação já haviam relatado a transmissão autóctone do vírus (Brasil 2016a) (FIGURA 9). Estima-se que o número de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV variou entre 440.000 e 1.300 000 no final de 2015 (Brasil 2015b).

Em 2016, foram registrados 216.207 casos prováveis (com 60,7% de casos confirmados) e incidência de 105,3 casos/100 mil habitantes. Foram confirmados laboratorialmente 8 óbitos por vírus Zika, a saber: RJ (4), Espírito Santo (ES) (2), MA (1) e PB (1). A análise segundo regiões geográficas, demonstrou que a região Centro-Oeste apresentou a maior taxa de incidência: 222,0 casos/100 mil habitantes (Brasil 2017).

Em 2017, foram registrados 17.452 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, com incidência de 8,5 casos/ 100 mil habitantes e destes, 8.839 (50,6%) foram confirmados, com as maiores taxas de incidência nos estados de MT e GO e Tocantins (TO). Foram confirmados laboratorialmente dois óbitos por ZIKV, nos estados de SP e Rondônia (RO). Em relação às gestantes, foram registrados 2.160 casos prováveis, sendo 949 confirmados por critério clínico-epidemiológico ou laboratorial. Em termos comparativos, percebe-se que, dentro de um ano, houve significativa diminuição de casos prováveis e confirmados, fato que pode estar associado ao desenvolvimento de memória imunológica conferida (Brasil 2018a).

Em 2018, até a semana epidemiológica 11 (31/12/2017 a 17/03/2018) foram registrados 1.486 casos prováveis de febre pelo ZIKV, com incidência de 0,7 casos/100 mil habitantes e 372 (25%) de casos confirmados (Brasil 2018b).

Em relação à introdução do ZIKV no Brasil, presume-se que o vírus tenha sido importado durante o torneio da Copa das Confederações, realizado em 2013 (Faria *et al.* 2016a). Outras hipóteses sugerem que a introdução do ZIKV seja proveniente da Polinésia Francesa pelos viajantes durante da Copa do Mundo de futebol realizado no Brasil em 2014 (Salvador & Fujita 2016), ou que possa ter ocorrido devido a visita do Papa Francisco, com muitos jovens católicos da África e Ásia visitando o Brasil durante a Jornada Mundial da Juventude em julho de 2013 (Epelboin *et al.* 2017), ou ainda durante o Campeonato Mundial de Canoagem de Primavera, realizado no Rio de Janeiro, Brasil em 2014 (Musso 2015). A introdução do ZIKV foi provavelmente despercebida porque as manifestações clínicas do ZIKV se confundem com aquelas causadas por outras arboviroses endêmicas no Brasil.

Desde 2007, quando foi detectada a primeira grande epidemia do ZIKV, em Yap, na Micronésia, 70 países e territórios já notificaram a transmissão do vírus por mosquitos – sendo 67 deles a partir de 2015 (WHO 2016a) (FIGURA 10).

Para o Brasil, a epidemia em 2015-2016 (Zanluca *et al.* 2015), gerou uma enorme preocupação, uma vez que diversos estudos indicaram a associação da infecção pelo ZIKV com manifestações congênitas, a exemplo da microcefalia, uma afecção craniana na qual o bebê nasce com o perímetro craniano com tamanho inferior ao normal e pode haver diferentes graus de acometimento neurológico (Mlakar *et al.* 2016, Brasil *et al.* 2016b). Além disto, foram relatados casos apresentando complicações neurológicas e a SGB (Oehler *et al.* 2014).

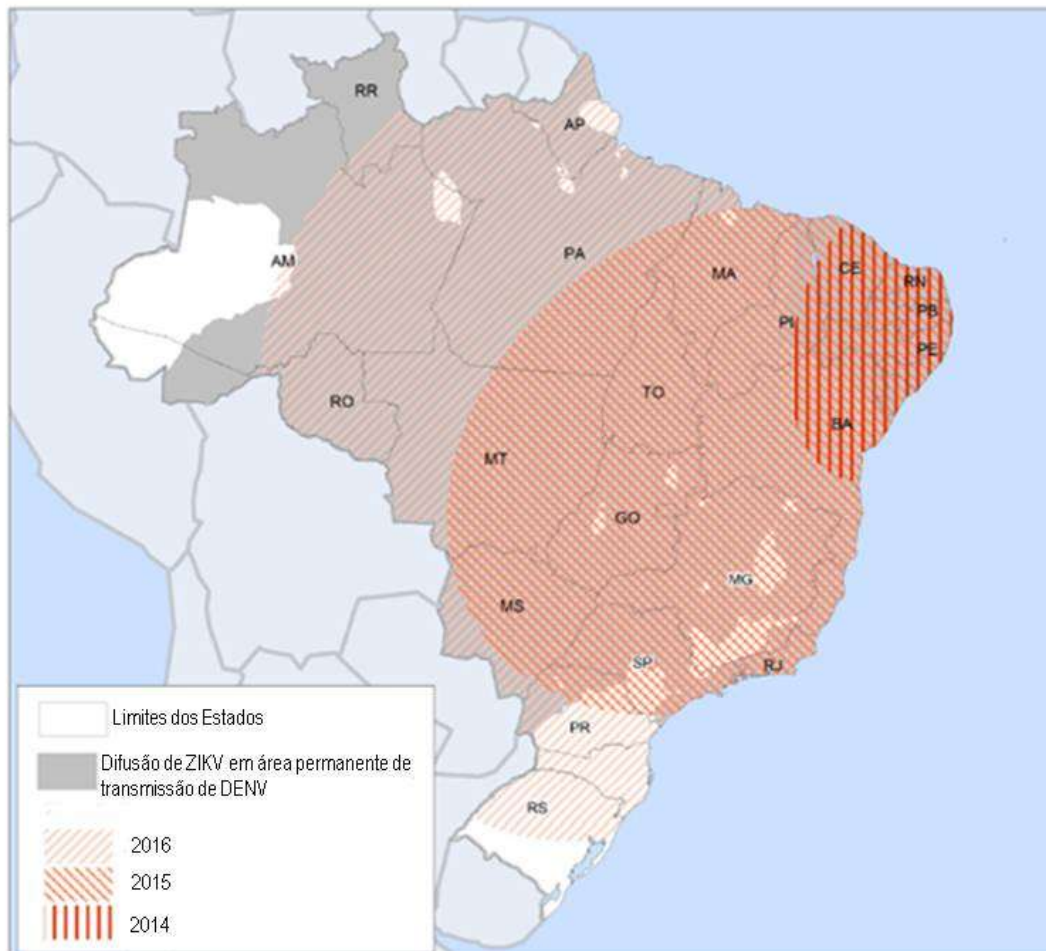


FIGURA 9: Distribuição espacial do ZIKV no Brasil. Casos reportados de 2014 a 2016, de acordo com dados epidemiológicos do Ministério da Saúde. As áreas de transmissão de dengue estão apresentadas em cinza. Adaptado de (Lowe *et al.* 2018)

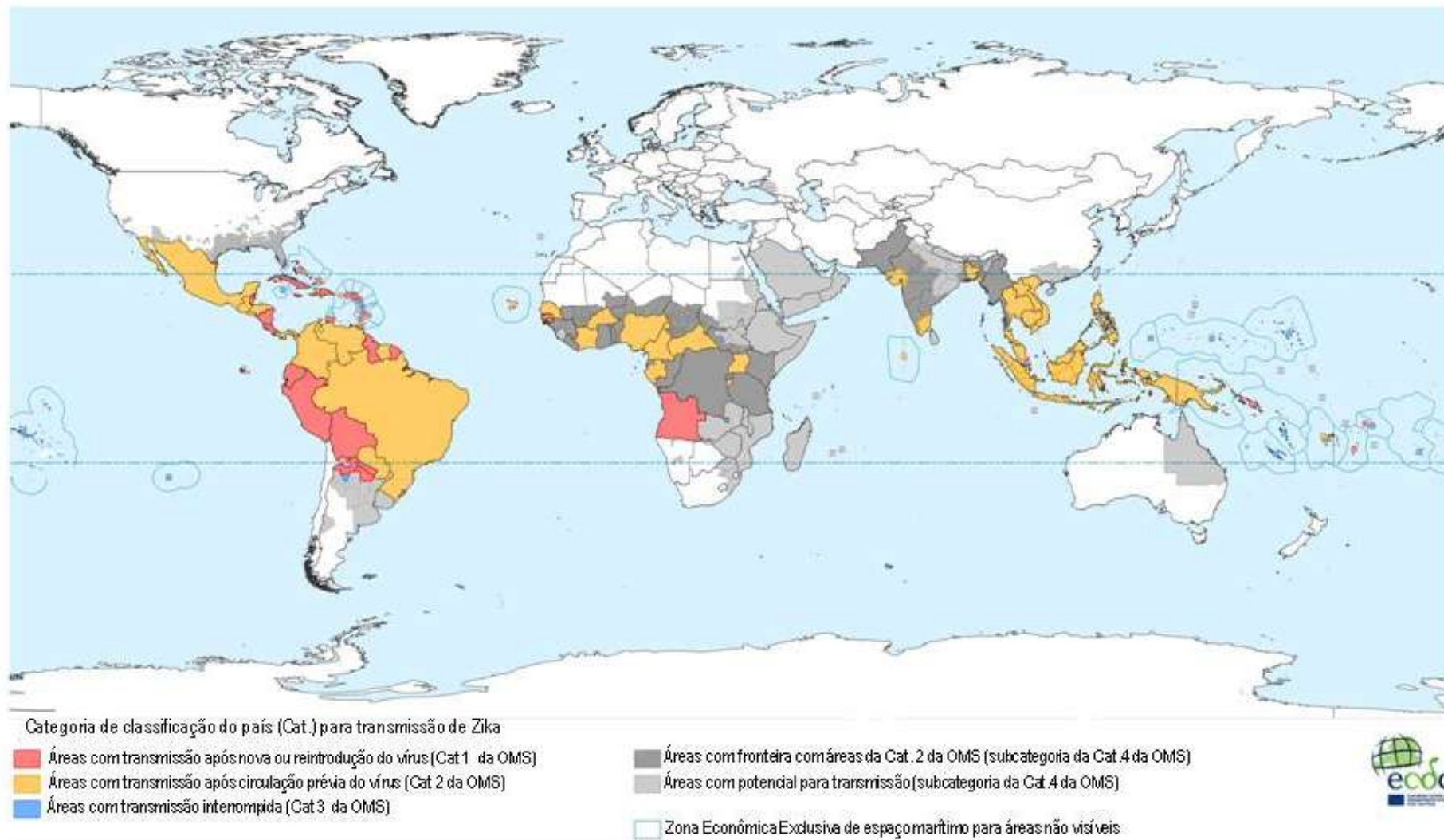


FIGURA 10: Áreas de transmissão do ZIKV. Fonte: Adaptado de ECDC (European Centre for Disease Prevention and Control)

3.2 FORMAS DE TRANSMISSÃO DO ZIKV

O ZIKV foi isolado de várias espécies de mosquitos pertencentes ao gênero *Aedes*, mas considera-se que os surtos recentes ocorreram principalmente devido à transmissão por mosquitos *Ae. aegypti*. A espécie é considerada o principal vetor de ZIKV por sua abundância urbana e natureza antropofílica (Hayes 2009, Kraemer *et al.* 2015).

A espécie *Ae. albopictus* é considerada um vetor secundário (Grard *et al.* 2014), pois assim como a espécie *Ae. aegypti*, o *Ae. albopictus* é capaz de transmitir outros flavivírus, incluindo DENV e vírus chikungunya (CHIKV). No entanto, ao contrário do *Ae. aegypti*, os mosquitos *Ae. albopictus* preferem áreas subpopuladas com vegetação significativa e picam os seres humanos e os animais oportunisticamente (Paupy *et al.* 2009). Contudo, o desmatamento e a expansão dos assentamentos humanos em áreas que antes eram relativamente desprovidas de seres humanos aumentaram a frequência de contato entre humanos e esta espécie, o que, por sua vez, levou à adaptação desta espécie ao nicho urbano (Kraemer *et al.* 2015).

É provável que as atuais configurações urbanas, bem como as condições de sobrevivência favoráveis encontradas pelos vetores sejam responsáveis por conduzir e sustentar os surtos regionais. No entanto, para além da transmissão vetorial, outros modos de transmissão representam a importação de ZIKV em regiões fora do território onde circulam os vetores ou em áreas que ainda não haviam experimentado surtos (Gregory *et al.* 2017).

Outras formas de transmissão documentadas incluem a transmissão sexual, transplacentária e perinatal e representam formas não vetoriais de transmissão do ZIKV (Besnard *et al.* 2014, Musso *et al.* 2015b, Adibi *et al.* 2016) (FIGURA 11).

O ZIKV foi detectado por RT-PCR na placenta, cordão umbilical, bem como no líquido amniótico de duas gestantes cujos fetos foram diagnosticados com microcefalia (Calvet *et al.* 2016) (FIGURA 12).

Cogita-se que a amamentação possa ser um meio potencial de transmissão do ZIKV, no entanto os dados confirmatórios permanecem limitados. Cavalcanti e colaboradores reportaram casos de quatro mães com infecções comprovadas em laboratório. Nenhuma doença evoluiu em três dos bebês amamentados, apesar da detecção de RNA viral no sangue e urina maternos e do isolamento de partículas infecciosas em uma amostra de leite. Os resultados sugeriram que apesar da presença de partículas virais no leite materno, isso pode não ser suficiente para a transmissão perinatal do ZIKV (Cavalcanti *et al.* 2017).

O vírus Zika também foi detectado na saliva humana (Musso *et al.* 2015a), sangue (Bearcroft 1956, Musso *et al.* 2014a), sêmen, urina (WHO 2016b) e no trato genital feminino (Prisant *et al.* 2016). Foi recentemente detectado no sêmen e na urina de, respectivamente, um paciente após 92 dias de infecção (Gaskell *et al.* 2017) e outro paciente após 62 dias de

infecção (Atkinson *et al.* 2016). A disseminação do vírus através de transfusão de sangue também foi relatada (Musso *et al.* 2016). Infecções por ZIKV foram ainda documentadas através de exposição ocupacional (CDC 2014).

Musso e colaboradores encontraram achados laboratoriais que propiciaram um maior suporte para a comprovação da transmissão sexual. Durante a epidemia de ZIKV na Polinésia Francesa, um paciente no Taiti apresentou hematospermia e uma alta carga viral com partículas replicativas do ZIKV isoladas em seu sêmen, o que sugeriu a replicação do vírus no trato genital masculino (Musso *et al.* 2015b). Embora nenhum outro arbovírus já tenha sido isolado do sêmen humano, esses achados sugeriram que o ZIKV estaria presente no fluido seminal. Esta hipótese foi confirmada por vários estudos que detectaram RNA viral em vários homens que apresentaram sintomas de infecção por ZIKV (Foy *et al.* 2011, Musso *et al.* 2015b, Atkinson *et al.* 2016). Além disso, a carga viral no líquido seminal foi significativamente maior do que na urina ou no sangue (Mansuy *et al.*, Musso *et al.* 2015b, Atkinson *et al.* 2016). Verificou-se ainda que partículas infecciosas podiam ser isoladas do sêmen mesmo após a depuração da viremia (Musso *et al.* 2015).

É pouco provável que a transmissão sexual cause grandes surtos de ZIKV. No entanto, há a possibilidade deste modo de transmissão desempenhar um papel significativo na importação do ZIKV para áreas que ainda não experimentaram um surto e em que a transmissão local do mosquito é menos provável (Foy *et al.* 2011).

Além disso, a persistência do ZIKV nos testículos sugeriu que este tecido pode atuar como um reservatório do qual novos ciclos de transmissão podem ser iniciados no futuro, como já foi o caso anteriormente para o vírus Ebola (Deen *et al.* 2015).

Devido ao aumento surpreendente do número de casos de microcefalia no Brasil logo após a epidemia de 2015, a possibilidade de infecção por transmissão transplacentária foi investigada. De forma alarmante, em 2016, mais de 4.000 casos de microcefalia foram relatados no período de quatro meses nos estados do nordeste do Brasil. Este número representou aumento de aproximadamente 20 vezes em relação a anos anteriores (Nunes *et al.* 2016a). Cogitou-se então a possibilidade de que o ZIKV pudesse atravessar a barreira placentária levando danos no sistema nervoso central (SNC) de fetos, da mesma forma que outros patógenos TORCH (*Toxoplasma gondii*, vírus da rubéola, citomegalovírus e vírus herpes simples). Finalmente em 2016, o ZIKV foi detectado no líquido amniótico de duas gestantes cujos fetos foram diagnosticados com microcefalia (Calvet *et al.* 2016). Além disso, estudo constatou a presença do ZIKV no tecido cerebral de feto acometido de microcefalia cuja mãe apresentou sinais de infecção por ZIKV (doença febril e erupção cutânea) no final do primeiro trimestre da gravidez (Mlakar *et al.* 2016). Desta forma, a transmissão materno-fetal ficou comprovada, e atualmente consiste em uma das principais preocupações nas áreas endêmicas.

O risco de microcefalia devido à infecção por ZIKV no primeiro trimestre da gravidez foi estimado em 0,88-13,2% (Johansson *et al.* 2016). No entanto, outros estudos relataram que o ZIKV pode atravessar a barreira placentária em qualquer estágio da gestação, causando efeitos teratogênicos (Oliveira Melo A. S. *et al.* 2016, Brasil *et al.* 2016b).

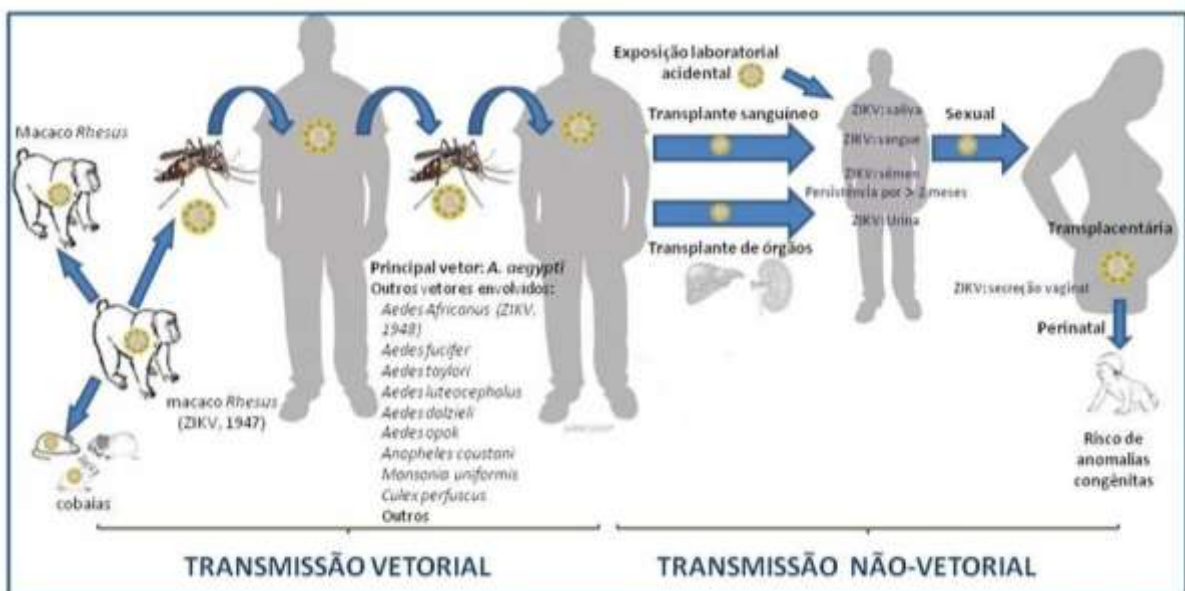


FIGURA 11: Vias de transmissão do ZIKV. Adaptado de Rodriguez-Morales *et al.*, 2016

3.3 MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS DA INFECÇÃO PELO ZIKV

A grande maioria das infecções por ZIKV é assintomática (80%). Quando sintomática, a infecção pelo ZIKV ocasiona uma doença autolimitada, semelhante à dengue com um período de incubação de até 10 dias. Os sinais e sintomas consistem em febre baixa, mialgia e erupção maculopapular, acompanhada por artralgia e cefaleia, e com menos frequência edema, dor de garganta e vômito (Duffy *et al.* 2009, Hayes 2009, Cao-Lormeau *et al.* 2014, Zanluca *et al.* 2015). Normalmente, a infecção pelo ZIKV não se associa com complicações graves, apresentando baixa taxa de hospitalização e poucos registros de óbitos. Em comparação com a dengue, a Zika é geralmente menos grave; cefaleia e mal-estar são mais leves sem complicações hemorrágicas e/ou de choque. A conjuntivite está frequentemente presente, enquanto a artralgia é menos pronunciada (Duffy *et al.* 2009).

A sintomatologia da infecção não é específica, podendo ser confundida com quadros ocasionados por outros Flavivírus, como DENV e CHIKV (Zanluca & Dos Santos 2016). As alterações laboratoriais incluem leucopenia transitória e, em alguns casos, trombocitopenia. As concentrações séricas de aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT) podem ou não estar elevadas. Os sintomas da infecção pelo ZIKV normalmente duram de 3 a 7 dias, mas a artralgia pode persistir por mais tempo em alguns indivíduos (Tappe *et al.* 2014).

3.4 SÍNDROME CONGÊNITA DO ZIKV

Ademais, apesar de ser uma infecção benigna na maior parte dos casos, surto de ZIKV foi de enorme preocupação para o Brasil, uma vez que estudos associaram a infecção pelo ZIKV com manifestações congênitas, a exemplo da microcefalia, uma afecção craniana na qual o bebê nasce com o perímetro craniano com tamanho inferior ao normal (FIGURA 13), podendo haver diferentes graus de acometimento neurológico, além de problemas oculares (Mlakar *et al.* 2016, Brasil *et al.* 2016a). As pesquisas demonstram que a microcefalia se manifesta como consequência de muitas anormalidades do sistema nervoso central (SNC), causadas pelo ZIKV.

Embora a microcefalia tenha recebido grande parte da atenção como consequência da infecção pelo ZIKV, amplo espectro de manifestações clínicas e malformações fetais associadas a infecção intrauterina foram descritos. Neste sentido, o termo Síndrome Congênita do ZIKV (SCZ) foi empregado para designar um conjunto de manifestações clínicas e alterações do SNC encontrados em crianças com a infecção congênita pelo ZIKV.

O neurotropismo do ZIKV leva a lesões funcionais e estruturais do SNC. As lesões estruturais incluem alterações na morfologia do crânio, cérebro, olhos e extremidades. As lesões funcionais, por outro lado, abrangem perda da função cerebral podendo evoluir de diferentes maneiras dependendo da reabilitação e estimulação que é oferecida a criança. A alteração da estrutura cerebral é consequência da extensa destruição cerebral com colapso nos ossos cranianos levando ao proeminente osso occipital típico, além da pele excessiva e redundante do couro cabeludo (Revisto por Proença-Modena *et al.* 2018).

Estudos de casos de microcefalia no Brasil demonstraram características clínicas tais como pele excessiva e redundante do couro cabeludo, artrogripose, distúrbios neurológicos como hipertonia, espasticidade, calcificações intracranianas, anormalidades oculares e hiperreflexia (Schuler-Faccini 2016, Brasil *et al.* 2016b).

3.5 COMPLICAÇÕES NEUROLÓGICAS PELA INFECÇÃO POR ZIKV

Da mesma forma como ocorre em outras viroses, complicações decorrentes da infecção pelo ZIKV também foram observadas. Relatos de casos da SGB durante infecções por ZIKV, principalmente em regiões de cocirculação com o DENV também foram descritos em adultos.

A SGB é uma neuropatia inflamatória autoimune que gera um quadro de fraqueza muscular, tetraparesia nos membros inferiores, parestesia das extremidades, mialgia difusa e paralisia facial assimétrica (Oehler *et al.* 2014).

A SGB foi confirmada em 55% de pacientes que apresentavam comprometimento neurológico e sintomas compatíveis com infecção por ZIKV na região Nordeste (PAHO, 2015). Além de SGB, mielite e meningoencefalites também foram relatadas em pacientes adultos (Pinheiro *et al.* 2016, Carod-Artal 2018).

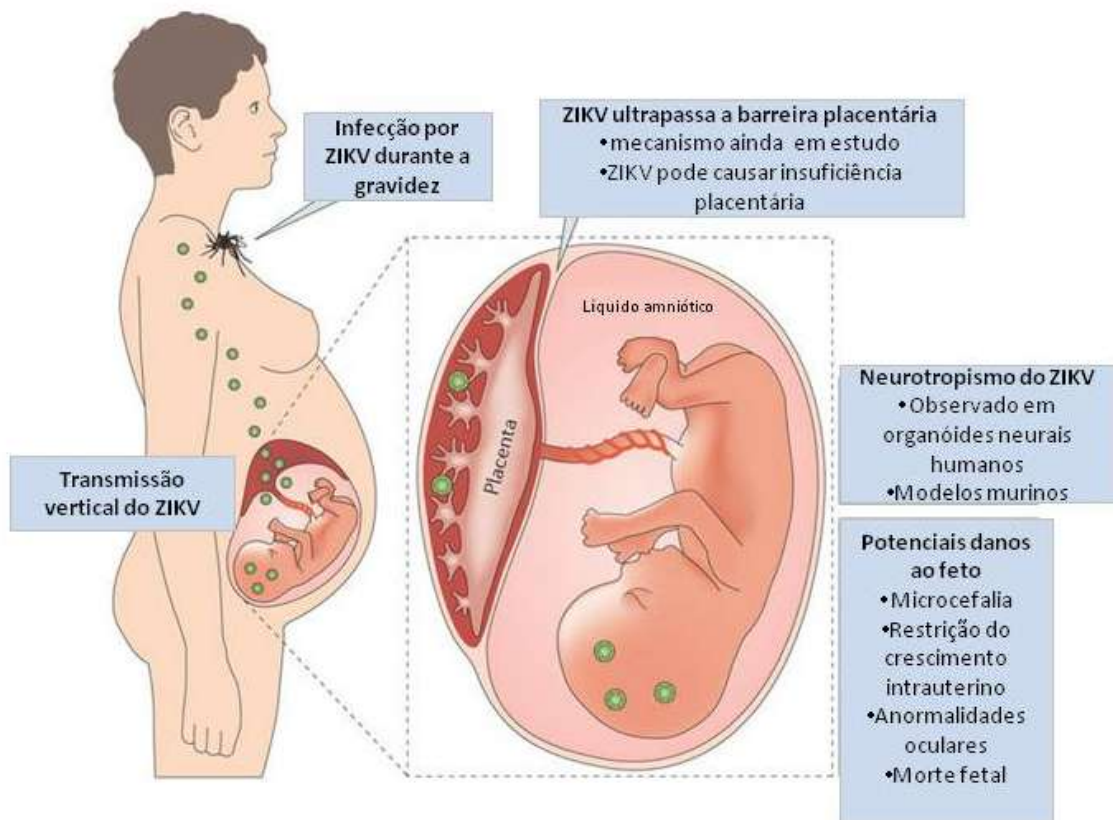


FIGURA 12: *Transmissão vertical e síndrome congênita induzida pelo ZIKV.* Depois de cruzar a barreira placentária, a infecção por ZIKV pode ter consequências devastadoras para o feto em desenvolvimento, que podem incluir microcefalia, hidranencefalia, restrição de crescimento, anormalidades oculares e morte. Fonte: Adaptado de (Coyne & Lazear 2016)



FIGURA 13: *Neonato normal e com síndrome congênita do ZIKA.* A ilustração evidencia a microcefalia moderada ou severa. (Petersen et al. 2016)

3.6 PATOGÊNESE DO ZIKV

A ZIKA é uma doença febril aguda e autolimitada e estima-se que maioria das infecções resultem em quadros assintomáticos e quadros clínicos brandos (Duffy *et al.*, 2009; Iosifidis *et al.*, 2014). No entanto, o aumento dramático na incidência de microcefalia, relatos de casos de SGB e complicações neurológicas (Oehler *et al.*, 2014b), chamou atenção da comunidade científica e vários estudos foram desenvolvidos visando compreensão dos mecanismos patogênicos do vírus, bem como o neurotropismo exibido. Apesar de muitos esforços e extensa literatura, a patogênese da infecção pelo ZIKV ainda é pouco conhecida.

3.6.1 TROPISMO VIRAL

Assim como outros flavivírus, é provável que o ZIKV infecte células das glândulas epiteliais e salivares do mosquito após ingestão de sangue de um indivíduo infectado. Depois de um período de 5-10 dias, o ZIKV pode ser encontrado na saliva do mosquito e transmitido para humanos. O mosquito contrai o vírus ao picar uma pessoa doente no período compreendido entre 24 horas antes da manifestação dos primeiros sintomas e seis dias depois (Wong *et al.* 2013).

Quando o mosquito infectado faz seu repasto sanguíneo, a saliva infectada deposita o vírus na epiderme e na derme do hospedeiro, o que leva à infecção por ZIKV tanto dos fibroblastos da pele do hospedeiro quanto dos queratinócitos (Hamel *et al.* 2015).

A identificação de mediadores da entrada do ZIKV nas células alvo representa um grande desafio na compreensão do tropismo e da patogênese do ZIKV (FIGURA 14). Pode-se depreender que a infecção destas células permite que os vírus se disseminem aos gânglios linfáticos regionais a partir dos quais pode atingir o fluxo sanguíneo e conseqüentemente outros tecidos, incluindo o SNC. Uma série de moléculas candidatas para este fim tem sido investigada. O modelo atual sugere que os flavivírus como DENV e ZIKV usam pelo menos dois conjuntos diferentes de moléculas para acessarem as células alvo: conjunto dos receptores de lectina do tipo C e dos receptores de fosfatidilserina, que incluem os receptores TIM (imunoglobulina de células T e domínio de mucina) e da família TAM (TYRO3, AXL e MER). O receptor AXL também foi implicado como um receptor de entrada para o ZIKV em células gliais humanas (astrócitos e microglia) (Meertens *et al.* 2017)

As evidências de infecção de fetos com microcefalia no útero e a detecção do genoma viral no líquido amniótico de gestantes sugeriu fortemente o potencial neurotrópico do vírus (Mlakar *et al.* 2016, Calvet *et al.* 2016). Os mecanismos pelos quais o ZIKV ultrapassa a barreira placentária e atinge o feto ainda são pouco conhecidos. No entanto, estudos com diferentes tipos de células neurais e placentárias, assim como modelos animais, levaram o desenvolvimento de hipóteses plausíveis: infecção do tecido fetal poderia envolver a transcitose do vírus através da placenta ou a infecção da própria placenta. Qualquer uma das opções poderia levar à disseminação do vírus no feto e à infecção subsequente do cérebro em desenvolvimento. A infecção da placenta e a resposta inflamatória resultante poderiam alterar indiretamente o desenvolvimento neural. (Proença-Modena *et al.* 2018). Estudos *in vitro* já mostraram que os macrófagos placentários (células de Hofbauer) e sinciotrofoblastos são permissivos a infecção pelo ZIKV (Quicke *et al.* 2016). Além disso, o ZIKV infecta citotrofoblastos, células endoteliais, fibroblastos e células Hofbauer das vilosidades coriônicas, além de células epiteliais amnióticas e progenitores trofoblásticas. A replicação do ZIKV nas células de Hofbauer, trofoblastos e neuroblastos parece ser dependente da via de sinalização JAK-STAT, uma vez que o bloqueio desta via resultou no aumento da replicação viral (Gavegnano *et al.* 2017). Sinciotrofoblastos humanos isolados do segundo trimestre de gestação produzem constitutivamente interferons tipo III e são resistentes a infecção pelo ZIKV (Corry *et al.* 2017).

Recentemente, células endoteliais microvasculares cerebrais (*Primary human brain microvascular endothelial cells* - hBMECs) foram apontadas como reservatórios da infecção. O estudo demonstrou que o ZIKV infecta e ativa as hBMECs sem alterar a permeabilidade endotelial. De forma importante, foi evidenciado que partículas virais infecciosas atravessam a monocamada celular através de mecanismo de transcitose (Papa *et al.* 2017).

Lazear e colaboradores (2016) avaliaram a infecção e patogênese de diferentes cepas de ZIKV. Os resultados demonstraram carga viral elevada nos tecidos do SNC de camundongos infectados que persistiu mesmo após desaparecimento dos sinais clínicos. Interessantemente, camundongos tratados com anticorpo monoclonal MAR1-5A3 (bloqueador do receptor do interferon tipo I - IFNAR1) foram mais susceptíveis a infecção pelo ZIKV demonstrando a importância das vias de sinalização dos interferons tipo I (IFN- α/β) (Lazear *et al.* 2016).

Estudo de Tang e colaboradores (2016) forneceu evidências do neurotropismo viral através do uso de organóides cerebrais derivados de células-tronco humanas de pluripotência induzida (hiPSCs). No trabalho em questão, as hiPSCs foram diferenciadas em células progenitoras neurais humanas específicas do prosencéfalo (hNPCs- população constitutiva de um cérebro embrionário) e posteriormente foram infectadas com ZIKV *in vitro*. Na ocasião, os pesquisadores descobriram que essas células são facilmente infectadas pelo vírus com 90% de células infectadas num período de três dias de inoculação (Tang *et al.* 2016). Destacadamente, este estudo demonstrou que a infecção de hNPCs por ZIKV leva à desregulação do ciclo celular e ao aumento no número de mortes celulares. Essas descobertas fornecem mais informações sobre o mecanismo pelo qual a infecção por ZIKV nas mães leva à doença do ao comprometimento do SNC em recém-nascidos (Park 2017).

Resultados interessantes também corroboraram a ideia de associação causal entre ZIKV com complicações do SNC. Garcez e colaboradores. (2016) examinaram os efeitos da infecção em células-tronco neurais humanas que crescem como neuroesferas e organoides cerebrais *in vitro*. Os resultados mostraram que as células-tronco neurais infectadas com ZIKV apresentavam anormalidades morfológicas e desprendimento celular quando se desenvolveram em neuroesferas. Nestas neuroesferas infectadas, ZIKV foi encontrado tanto ligado às membranas quanto nas mitocôndrias e vesículas, mostrando que ZIKV atinge células cerebrais humanas e interfere na neurogênese durante o desenvolvimento cerebral (Garcez *et al.* 2016).

Destaca-se que a via de ativação do TLR3 (*Toll Like receptor 3 -TLR3*) nas células do SNC induziu a apoptose e atenuação da neurogênese contribuindo para a patologia fetal (Dang *et al.* 2016)

A infecção de gestantes pelo ZIKV tem sido associada a anormalidades congênitas em seus bebês, mas é incerto dizer em que momento o conceito humano é mais vulnerável ao vírus, durante a gravidez. Até momento, as observações sugerem que o feto em desenvolvimento pode ser mais vulnerável ao ZIKV no início do primeiro trimestre antes que uma zona protetora de trofoblasto viloso maduro tenha sido estabelecida. Assim, os fetos de mulheres infectadas pelo ZIKV durante este período da gestação apresentariam maior risco de nascer com complicações neurológicas, tais como a microcefalia, do que os bebês de mães que entraram em contato com o vírus em fases posteriores da gestação (Sheridan *et al.* 2017). De acordo com o estudo de Sheridan e colaboradores (2017), o ambiente favorável nos primeiros meses de gestação facilita o escape viral da barreira placentária. Nesta fase, as células placentárias produzem proteínas que estimulam a entrada do vírus nas células do feto em formação que ainda não possui resposta imunológica para evitar a infecção pelo ZIKV (Sheridan *et al.* 2017).

Por outro lado, a despeito dessas proposições, verificou-se casos de danos ao bebê em diferentes idades gestacionais, incluindo o trimestre final, sugerindo que a síndrome congênita do zika pode se apresentar em qualquer momento da gestação (Brasil *et al.* 2016b, Soares de Souza *et al.* 2016).

O ZIKV também foi detectado em outros tecidos e fluidos corporais. Estudos com lesões oculares demonstraram a presença do vírus no tecido ocular de camundongos tais como córnea, retina e nervo óptico. Além disso, o ZIKV foi detectado no fluido lacrimal. Células do trato reprodutivo incluindo as espermatogônias, células de Sertoli, epitélio e fibroblastos uterinos foram também descritas como alvos potenciais da infecção (Revisto por Miner & Diamond 2017).



FIGURA 14: Tropismo do vírus Zika. Estudos em humanos e modelos animais (camundongos e primatas não humanos- PNH) detectaram ZIKV em células da placenta, incluindo células Hofbauer (*in vitro* e em tecido humano explantado da placenta), trofoblastos (camundongos, primatas não humanos e humanos), e células endoteliais (*in vitro* em tecido placentário humano explantado e *in vivo* em placenta de camundongos). Outros alvos celulares do ZIKV incluem tipos de células neuronais, incluindo células progenitoras neurais e neurônios maduros (camundongos, PNH e humanos) e astrócitos (culturas de células humanas *in vitro*). Além disso, o ZIKV infecta os tecidos oculares, incluindo a córnea, a retina neurosensorial e o nervo óptico (camundongos), bem como o humor aquoso da câmara anterior (humanos). O ZIKV também tem como alvo células do trato reprodutivo, incluindo espermatogônias, células de Sertoli e células de Leydig (nos testículos de camundongos), espermatozoides (amostras de camundongos e humanos) e do epitélio vaginal (camundongos) e fibroblastos uterinos (infecção *in vitro* de amostras humanas). O tropismo resulta na detecção do ZIKV em vários fluidos corporais, incluindo fluido conjuntival ou lágrimas (camundongos e humanos), saliva (PNH e humanos), sêmen (camundongos, PNHs e humanos), muco cervical (humanos), lavagens vaginais (camundongos e humanos) e urina (PNH e humanos). Fonte: Adaptado de (Miner & Diamond 2017)

3.6.2 RESPOSTA IMUNE A INFECÇÃO PELO ZIKV: REATIVIDADE CRUZADA ENTRE ZIKV E DENV.

A imunidade humoral mediada por anticorpos desempenha um papel crucial no controle dos *flavivírus*. Anticorpos neutralizantes dirigidos a epítomos localizados em todos os três domínios estruturais da proteína E, fornecem proteção contra os *flavivírus in vivo*, mas também podem promover aumento da carga viral, por meio do fenômeno de ADE (vide tópico 2.3.1) (Dai Lianpan *et al.* 2016, Khandia *et al.* 2018).

Considerando que muitas questões permanecem sem resposta sobre a biologia incomum e espectro da infecção por ZIKV, existe a especulação de que os anticorpos contra flavivírus poderiam aumentar a replicação do ZIKV gerando implicações importantes na patogênese da doença e nos programas de vacinação tanto para dengue quanto para zika. Os anticorpos de reação cruzada teriam implicações no design da vacina contra ZIKV, pois poderiam resultar em doença exacerbada nos indivíduos que já tiveram dengue (Dejnirattisai *et al.* 2016).

O ZIKV é filogeneticamente relacionado com outros flavivírus, como o DENV e o WNV, que cocirculam com o ZIKV em muitas regiões do mundo. O Brasil, bem como outros territórios, é considerado uma área endêmica, o que resulta em um número considerável de indivíduos que fizeram soroconversão pelo DENV (Bardina *et al.* 2017).

Devido ao alto grau de semelhança estrutural e sequencial entre o ZIKV e o DENV, estudos sugeriram que a presença de anticorpos de reatividade cruzada em indivíduos que já tiveram dengue teria um papel importante numa subsequente infecção pelo ZIKV (Priyamvada *et al.* 2016, Stettler *et al.* 2016, Dejnirattisai *et al.* 2016). Corroborando com este achado, recentemente foi demonstrado que anticorpos anti-DENV foram pouco neutralizantes e capazes de promover ADE na infecção por ZIKV. Viram também que o plasma de indivíduos infectados pelo DENV foi capaz de promover ADE pelo ZIKV *in vitro*. Além disso, também foi observado que o plasma de indivíduos infectados pelo DENV foi capaz de promover ADE na linhagem de células mielóides humanas U937, linhagem que é relativamente resistente/pouco permissiva à infecção pelo DENV e ZIKV na ausência de ADE (Dejnirattisai *et al.* 2016).

A ADE também já foi demonstrada *in vitro* com outros *flavivírus*, como o WNV. Utilizando plasma de indivíduos infectados por DENV e WNV em fase convalescente, o trabalho de Bardina e colaboradores (2017) verificou um substancial aumento da infecção por ZIKV mediado pelo envolvimento de receptores de Fc da imunoglobulina G. A administração de plasma de pacientes convalescentes infectados por DENV ou WNV em camundongos suscetíveis ao ZIKV resultou em aumento da morbidade - incluindo febre, viremia e cargas virais na medula espinhal e nos testículos - e aumento da mortalidade.

Em contraste, estudos com pacientes naturalmente infectados não demonstraram fenômeno da ADE entre dengue e zika, uma vez que nem viremia ou níveis de citocinas foram maiores nos pacientes com ZIKV e infecção prévia pelo DENV (Terzian *et al.* 2017). Estudos mais detalhados em modelos animais e evidências epidemiológicas são necessários para confirmar se o fenômeno de ADE ocorre *in vivo* e se teria relação com a patogênese do ZIKV.

4. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL

O desafio no diagnóstico clínico diferencial diante de uma tríplice epidemia (dengue, Zika e chikungunya) destaca a importância dos testes de diagnóstico laboratorial para o gerenciamento clínico, vigilância epidemiológica e pesquisa.

Os métodos laboratoriais para a confirmação de infecção pelos DENV envolvem detecção do vírus através do isolamento viral em células de mosquito *Ae. albopictus* clone C6/36 (Nogueira *et al.* 1988), do ácido nucleico viral (Lanciotti *et al.* 1992), captura de antígeno (NS1) (Lima *et al.* 2010) e detecção de anticorpos específicos (IgM/IgG), ou a combinação dessas técnicas (WHO 2009).

No caso de dengue, a viremia é detectável por cerca de 4 a 5 dias após o início dos sintomas e se correlaciona fortemente com a duração da febre. Em uma infecção primária, os anticorpos anti-DENV da classe IgG evoluem de forma relativamente lenta, com baixos títulos no período de 8 a 10 dias após o início da febre, enquanto os anticorpos anti-DENV da classe IgM são detectados a partir de 5 dias após o início da febre podendo durar até 3 meses. Durante infecções secundárias, os anticorpos IgG evoluem rapidamente, com altos títulos logo após o início da febre. Em alguns casos, os anticorpos IgM podem ser indetectáveis. O soro é a amostra de escolha, embora plasma, sangue e tecidos (fígado, baço, linfonodos, pulmão e cérebro coletados de casos fatais) também sejam úteis (WHO 2009).

A secreção da proteína não estrutural-1 viral (NS-1) por células infectadas pelo DENV oferece uma janela de oportunidade para o diagnóstico precoce, porque a NS1 pode ser detectada no sangue até 9 dias após o início da febre e em amostras de tecido (Lima *et al.* 2011). Testes comerciais rápidos e kits de ELISA estão disponíveis, produzindo sensibilidades variando de 54 a 93%, com menor sensibilidade em infecções secundárias (Guzman *et al.* 2010). A detecção de anticorpos anti-DENV classe IgM, revelam uma infecção ativa ou recente, é o teste mais utilizado na vigilância laboratorial. Diferentes formatos de ELISA detectam anticorpos da classe IgM com diferentes graus de sensibilidade e especificidade (Hunsperger *et al.* 2009).

O diagnóstico laboratorial para confirmação de infecção pelo ZIKV é o RT-PCR (Lanccioti et al 2008) realizada em laboratórios de referência da rede do Sistema Único de Saúde (SUS). A detecção de RNA viral no soro é restringida aos primeiros 5 dias da doença (CDC 2016). No entanto, é possível detectar o RNA viral na urina por mais 2 a 3 semanas (Hirayama *et al.* 2012, Gourinat *et al.* 2015, Campos *et al.* 2015, Pessoa *et al.* 2016).

Já existem ensaios sorológicos comerciais disponíveis para a detecção de anticorpos específicos para ZIKV. No entanto, a sensibilidade e especificidade dos testes de ELISA para quantificação dos anticorpos anti-ZIKV classe IgM e IgG são bastante questionáveis, visto que existe forte reatividade entre ZIKV, DENV e outros flavivírus. Além disso, na fase inicial da infecção, as taxas de anticorpos anti-ZIKV da classe IgM e IgG são muito baixas, tornando difícil a confirmação do diagnóstico. A detecção de anticorpos deve ser confirmada por um ensaio de neutralização complementar, permitindo determinar a especificidade dos anticorpos detectados (por exemplo, testes de neutralização por redução de placa -PRNT). A aplicabilidade do teste para detecção de anticorpos IgM pode depender da situação clínica. A duração dos anticorpos anti-ZIKV da classe IgM ainda não foram estabelecidas, mas existem indícios de que os anticorpos IgM podem ser úteis no diagnóstico da síndrome congênita do zika. Trabalho brasileiro, conduzido por Cordeiro e colaboradores detectou anticorpos IgM no líquido cerebrospinal de 30 neonatos com microcefalia (Cordeiro *et al.* 2016).

O diagnóstico laboratorial da febre chikungunya é realizado através de métodos virológicos ou sorológicos. Os métodos virológicos incluem o isolamento viral e a reação da transcriptase reversa seguida de reação em cadeia pela polimerase (RT-PCR) (Lanciotti *et al.* 2007). Os anticorpos da classe IgM e/ou IgG começam a ser detectados no período de 7 dias após o início dos sintomas, representando o momento ideal para realização do diagnóstico sorológico através dos testes de ELISA e PRNT (da Cunha & Trinta 2017).

Os testes moleculares (RT-PCR) são indicados para a realização do diagnóstico diferencial das arboviroses circulantes no Brasil. O RNA viral pode ser extraído do soro, sangue, plasma, tecidos (incluindo espécimes fixados com formol), sangue coletado em papel filtro e (mais recentemente) saliva. O ensaio de inibição da hemaglutinação (HI), ELISA para detecção de anticorpos da classe IgG e ensaios de PRNT são úteis para detecção de exposição prévia (CDC 2016).

II. JUSTIFICATIVA

Atualmente, o Brasil vive uma tríplice epidemia causada pelos arbovírus DENV, CHIKV e ZIKV. As infecções em questão são transmitidas principalmente pela picada de mosquitos hematófagos fêmeas do gênero *Aedes*. As epidemias resultam em grandes problemas para a saúde pública ocasionando alto índice de internações, morbidade e mortalidade.

Desde a introdução do DENV-1 em 1986, o Brasil vem sofrendo com sucessivas epidemias de dengue com grande impacto na saúde da população. A febre de chikungunya começou a se espalhar pelo mundo em 2013, e em 2014 a doença acometeu milhares de pessoas no Brasil. De forma dramática, em 2015 vivenciamos a constatação da associação de epidemia de microcefalia com a infecção pelo ZIKV na região Nordeste do país o que por sua vez gerou uma situação de emergência em saúde pública. Além disso, a presença concomitante dos três vírus levou a um diagnóstico diferencial difícil para os médicos, uma vez que as infecções têm sinais e sintomas bastante parecidos, tornando o diagnóstico clínico complexo. Provavelmente devido à cocirculação dos três vírus, casos de pacientes comprovadamente coinfectados pelo DENV/ZIKV, DENV/CHIKV e CHIKV/ZIKV já foram reportados. No entanto, ainda é desconhecido o desfecho clínico em pacientes coinfectados e risco potencial de desenvolvimento de formas clínicas mais graves. Fatores do hospedeiro, virais e epidemiológicos podem estar associados à patogênese das doenças, no entanto os mecanismos envolvidos em cada arbovirose isoladamente ainda não são completamente conhecidos.

Em relação à resposta imunológica, o aumento significativo de vários mediadores inflamatórios solúveis, é um evento bastante conhecido na dengue, como “tempestade de citocinas” e está presente nas formas mais graves da dengue. O papel destes mediadores na infecção pelo ZIKV e sua importância nas formas clínicas da doença ainda é pouco conhecido assim como nos indivíduos coinfectados. Visamos, portanto, neste estudo, analisar os aspectos epidemiológicos, laboratoriais, clínicos e imunológicos de pacientes naturalmente infectados pelos arbovírus dengue e zika originários da cidade de Campo Grande, MS, Brasil. A aplicação de metodologias visando o diagnóstico diferencial dos arbovírus circulantes e a identificação de casos de coinfeções são imprescindíveis na vigilância epidemiológica do país. Além disso, a identificação de marcadores, associados tanto ao hospedeiro quanto ao vírus, poderá contribuir na predição de risco aumentado para o desenvolvimento de formas graves da doença, conseqüentemente, contribuindo para as resoluções terapêuticas precoces.

A identificação parâmetros clínicos e de biomarcadores associados a patogênese dessas viroses torna-se um importante aliado capaz de predizer um risco aumentado de desenvolvimento de formas graves da doença; além disso poderá auxiliar no diagnóstico diferencial destes agravos.

III. OBJETIVOS GERAL E ESPECÍFICOS

5. OBJETIVO GERAL

Caracterizar os aspectos clínicos, epidemiológicos, virais e imunológicos de casos de dengue ou zika originários da epidemia de 2016 no estado do Mato Grosso do Sul.

5.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

1) Identificar a origem e distribuição dos casos investigados durante o período estudado;

2) Avaliar a contribuição das técnicas de RT-PCR para identificação do sorotipo viral e dos métodos sorológicos (MAC-ELISA, IgG-ELISA e Captura de NS1) para a confirmação dos casos suspeitos;

3) Descrever as características demográficas dos casos confirmados a fim de contribuir com a compreensão da epidemiologia local.

4) Identificar a prevalência das manifestações clínicas apresentadas por casos confirmados de dengue e/ ou zika durante o período estudado, a fim de traçar um perfil da região, contribuindo assim com futuras avaliações clínicas de pacientes do local.

5) Identificar marcadores clínicos e laboratoriais de pacientes agudos monoinfectados pelo DENV ou ZIKV e ainda, coinfectados por estes vírus, na tentativa de contribuir para o diagnóstico diferencial entre as duas diferentes viroses.

6) Avaliar o perfil de citocinas e quimiocinas circulantes nos casos confirmados, a fim de comparar o perfil desses fatores nos pacientes infectados por dengue, zika e coinfectados,

IV. MATERIAIS E MÉTODOS

6. CONSIDERAÇÕES ÉTICAS:

A inclusão dos pacientes foi feita mediante a assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido. O projeto dispõe de aprovação pelo Sistema Plataforma Brasil sob os números CAAE 13318113.7.3001.0021 e CAAE 57221416.0.1001.5248 (Anexo A).

7. DESENHO DE ESTUDO

Este estudo é do tipo prospectivo, descritivo, observacional e transversal.

8. POPULAÇÃO DE ESTUDO

8.1 INVESTIGAÇÃO DE CASOS SUSPEITOS DE INFECÇÃO PELO DE DENV, ZIKV OU CHIKV NA REGIÃO CENTRO-OESTE DO BRASIL, A PARTIR DE UMA TRÍPLICE EPIDEMIA DE ARBOVIROSES OCORRIDA EM 2016 NA CIDADE DE CAMPO GRANDE (MS)

Para a investigação de casos suspeitos da infecção por DENV, ZIKV e CHIKV na região Centro-Oeste do Brasil, um total de 134 amostras foram coletadas em um trabalho de campo realizado na cidade de Campo Grande (MS) durante o período de 16 de fevereiro a 05 de março de 2016 como parte de colaboração estabelecida com o Dr. Rivaldo Venâncio da Cunha (UFMS e FIOCRUZ/MS) e com a Dra. Márcia Dal Fabbro da UPA Coronel Antonino (FIGURA 15). Destas, 119/134 (88,80%) foram classificadas como amostras agudas (≤ 7 dias após o início dos sintomas) e 15/134 (11,19%) como amostras convalescentes (> 7 dias após o início dos sintomas), sendo todas estas submetidas ao diagnóstico molecular e sorológico para estes vírus.

O levantamento dos dados clínicos e demográficos (idade, sexo, comorbidade) foi realizado através do preenchimento de uma ficha clínica previamente elaborada para o projeto (Anexo B). Os resultados de exames laboratoriais (hematológicos e bioquímicos) foram analisados através da consulta dos prontuários com a devida autorização do chefe do serviço de atendimento médico. Além disso, foram analisadas amostras de doadores saudáveis (controles), que não apresentaram episódios febris nos últimos três meses ou histórico de outras doenças. As amostras negativas para todos os testes de diagnóstico laboratorial coletadas durante o período de estudo foram também utilizadas nas análises clínicas e laboratoriais.

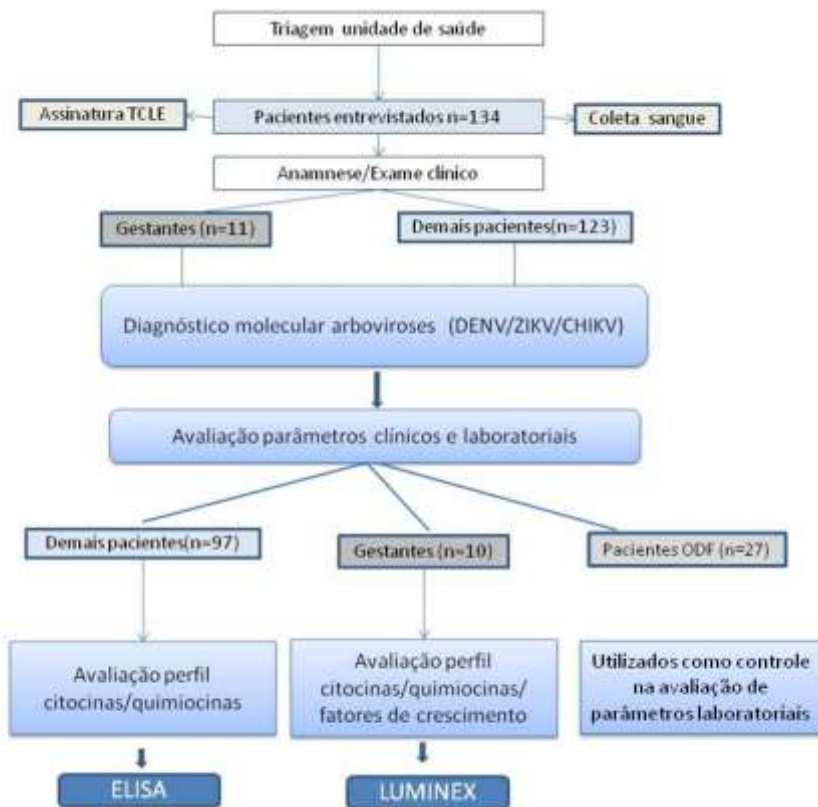


FIGURA 15: Esquema do desenho experimental do estudo

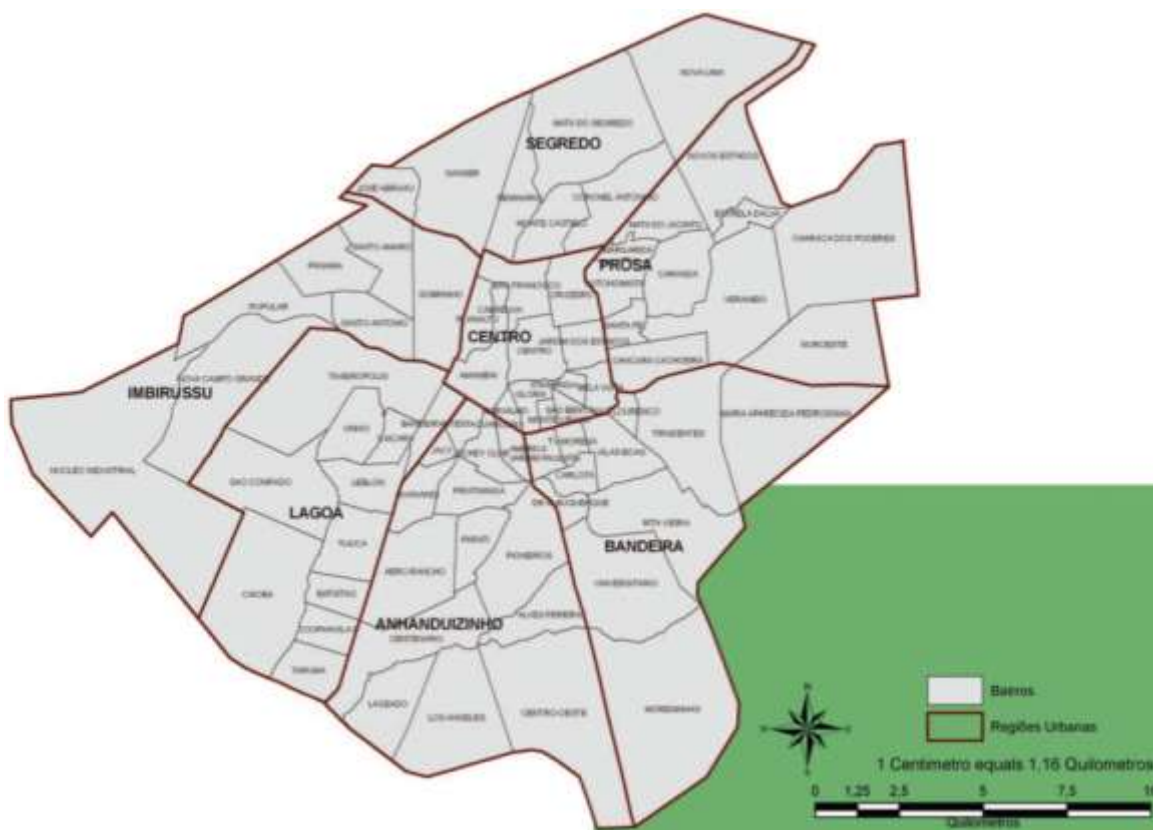


FIGURA 16: Procedência dos casos suspeitos de infecção por arbovírus (n=134) a partir de uma tríplice epidemia ocorrida em 2016 na cidade de Campo Grande (MS), região Centro-Oeste do Brasil.

8.2 DEFINIÇÃO DE CASO

Para os casos suspeitos de dengue, utilizamos os critérios do Ministério da Saúde, 2016. Desta forma foram considerados casos suspeitos os pacientes que apresentaram doença febril aguda, com duração máxima de sete dias, acompanhada de pelo menos dois dos sinais ou sintomas como cefaleia, dor retro orbitária, mialgia, artralgia, prostração ou exantema, associados ou não a presença de sangramentos ou hemorragias, com historia epidemiológica positiva para dengue (Brasil 2016c).

Os casos suspeitos de zika foram todos os pacientes que apresentaram exantema maculopapular pruriginoso acompanhado de dois ou mais dos sintomas: febre, hiperemia conjutival, poliartralgia e edema periarticular (Brasil 2016c, Cunha *et al.* 2016)

Em relação à infecção pelo CHIKV, foram considerados casos suspeitos todo o paciente com febre de início súbito maior que 38,5°C, que apresentou artralgia ou artrite intensa de início agudo, não explicado por outras condições, sendo residente ou tendo visitado áreas endêmicas ou epidêmicas até duas semanas antes do início dos sintomas ou que tenha vínculo epidemiológico com caso confirmado (Brasil 2015b)

8.3 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL

As amostras de sangue de pacientes foram coletadas e os diagnósticos diferenciais de infecção por DENV, CHIKV e ZIKV foram realizados pelo próprio Centro e confirmados posteriormente pelo Laboratório de Flavivírus (LABFLA-IOC). As amostras do MS (soro ou plasma) foram classificados como casos agudos (≤ 7 dias após o início dos sintomas) e posteriormente foram submetidos às metodologias sorológicas e moleculares para o diagnóstico laboratorial diferencial (Quadro1).

Para dengue foram utilizados o *kit* Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália), o Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA), o ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA), sendo a detecção molecular e tipagem realizada de acordo com Lanciotti *et al.* (1992), com o protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Johnson *et al.* (2005) e com o *kit* Simplexa™ DENV (*Focus Diagnostics, California, EUA*).

Para a investigação de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV as amostras foram testadas para ZIKV pela metodologia de RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti *et al.* (2008). Não foram utilizados testes sorológicos na investigação de casos suspeitos de ZIKV devido à possibilidade de reatividade cruzada com outros *Flavivirus* nos testes disponíveis.

Para a investigação de casos suspeitos de infecção pelo CHIKV, as amostras foram submetidas às metodologias sorológicas e moleculares para o diagnóstico de CHIKV pelo teste “padrão-ouro” ELISA de captura de IgM anti-CHIKV de acordo com o protocolo preconizado pelo Ministério da Saúde (2014), *kit* Anti-CHIKV ELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha), RT-PCR para detecção do CHIKV descrito por Lanciotti et. al (2007) e o *kit* Simplexa™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, EUA).

Todas as amostras também foram testadas para detecção do RNA viral do vírus MAYV gênero *Alfavirus* seguindo o protocolo de (Coimbra et al. 2007).

8.3.1 EXTRAÇÃO DO RNA VIRAL

O RNA total das amostras suspeitas de arboviroses foi extraído a partir do soro, plasma e/ou sangue total utilizando o kit comercial QIAamp Viral RNA Mini kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), seguindo as instruções do fabricante. O RNA viral obtido por esta metodologia foi armazenado em -70°C para posterior realização do diagnóstico molecular.

QUADRO 1: Métodos de diagnóstico laboratorial empregados para a investigação de casos suspeitos de dengue, zika e chikungunya durante a tríplice epidemia ocorrida no Mato Grosso do Sul, MS, Brasil em 2016.

VÍRUS	ESTRATÉGIA	PROTOCOLO
DENV	Métodos sorológicos	Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)
		Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA)
		ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, USA)
	Métodos moleculares	RT-PCR Convencional (Lanciotti et al. 1992)
		Simplexa™ Dengue Real Time RT-PCR (Focus Diagnostics, California, USA)
		Real Time RT-PCR (Johnson et al., 2005)
CHIKV	Métodos sorológicos	Anti-CHIKV IgM capture ELISA (CDC and Brazilian MoH, 2014)
		Anti-CHIKV IgM ELISA (Euroimmun, Lubeck, Germany)
	Métodos moleculares	Real Time RT-PCR (Lanciotti et al. 2007)
ZIKV	Métodos moleculares	Chikungunya NSP2 Standard kit (Genesig, England, UK)
		Real Time RT-PCR (Lanciotti et al. 2008)
MAYV	Métodos moleculares	Real Time RT-PCR (Coimbra et al. 2007)

8.3.2 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DA CLASSE IgM PARA DENV

A determinação de anticorpos da classe IgM para DENV foi realizada através do kits comerciais *Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)* com sensibilidade de 94,7% e especificidade de 100%, e *Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA)* com sensibilidade de 96% e especificidade de 97%, ambos realizados de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

8.3.3 TESTE DE CAPTURA DO ANTÍGENO NS1 DE DENV

O teste de captura do antígeno NS1 para DENV foi realizado através do *kit* comercial *ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA)* com sensibilidade de 95% e especificidade de 100%, de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

8.3.4 INFECÇÃO PRIMÁRIA E SECUNDÁRIA

A análise de anticorpos anti-DENV da classe IgG específicos, foi realizada a fim de determinar se a infecção era primária ou secundária utilizando método de Miagostovich *et al.* (1999).

8.3.5 RT-PCR PARA DETECÇÃO E TIPAGEM DOS DENV

A detecção e sorotipagem de amostras de DENV foi realizada a partir da metodologia de RT-PCR, descrita por Lanciotti *et al.* (1992), que utiliza uma reação *semi-nested*, capaz de identificar simultaneamente os quatro sorotipos de dengue (DENV1 a 4) através de duas reações utilizando oligonucleotídeos iniciadores consensuais e específicos para cada sorotipo. O outro protocolo para detecção e tipagem de dengue foi utilizado neste estudo e consiste em uma transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção dos DENV realizada em microplaca óptica (*Applied Biosystems, California, EUA*) de acordo com o protocolo descrito por Johnson *et al.* (2005). Outro protocolo de qRT-PCR provenientes do *kit* comercial *Simplexa™ (Focus Diagnostics, California, EUA)* foi utilizado de acordo com as instruções do fabricante em termociclador *3M Integrated Cyclor (Focus Diagnostics, California, EUA)*.

8.3.6 RT-PCR PARA DETECÇÃO DO ZIKV

A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do ZIKV foi realizada em microplaca óptica (*Applied Biosystems, California, EUA*) de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (2008). Neste procedimento, 5µL de RNA foi aplicado em 15 µL de uma mistura contendo H₂O livre de nucleases (*Promega, Wisconsin, EUA*), *GoTaq® Probe qPCR Master Mix (Promega, Wisconsin, EUA)*, *GoScript™ Reverse Transcription System (Promega, Wisconsin, EUA)*. A reação foi realizada em termociclador *LineGene 9600 (Bioer Technology, Zhejiang, China)* de acordo com os seguintes parâmetros de termociclagem: transcrição reversa (1 ciclo de 45°C por 15 min); ativação (1 ciclo de 95°C por 2 min); desnaturação (45 ciclos de 95° C por 15 sec) e anelamento/extensão (45 ciclos de 60°C por 1 min).

8.3.7 QUANTIFICAÇÃO DE ANTICORPOS DA CLASSE IGM PARA CHIKV (MAC-ELISA)

A determinação de anticorpos da classe IgM para CHIKV foi realizada de acordo com o método *in house* ELISA de captura de IgM anti-CHIKV preconizado e descrito pelo Ministério da Saúde (2014) e pelo kit comercial anti-CHIK VELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha). O kit comercial anti-CHIKV ELISA IgM (Sensibilidade: 98,1%; Especificidade: 98,9%), foi realizado de acordo com o protocolo descrito pelo fabricante.

8.3.8 RT-PCR EM TEMPO REAL (QRT-PCR) PARA DETECÇÃO DE CHIKV

A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do CHIKV foi realizada em microplaca óptica (*Applied Biosystems, California, EUA*) de acordo com o protocolo descrito por Lanciotti *et al.* (2007). Outros protocolos de qRT-PCR provenientes de *kits* comerciais foram utilizados de acordo com as instruções do fabricante. O Simplexa™ CHIKV (*Focus Diagnostics, California, EUA*) realizado em termociclador *3M Integrated Cyclor* (*Focus Diagnostics, California, EUA*) e o *Chikungunya Non structural protein 2 (NSP2) Standard kit* (*Genesig®, Inglaterra, Reino Unido*) para quantificação dos casos confirmados de CHIKV através do princípio TaqMan®, realizado em termociclador *LineGene 9600* (*Bioer Technology, Zhejiang, China*).

8.3.9 RT-PCR PARA DETECÇÃO DO VÍRUS MAYARO (MAYV)

A transcrição reversa seguida pela reação em cadeia pela polimerase em tempo real (qRT-PCR) para detecção do MAYV foi realizada de acordo protocolo de Coimbra *et al.* (2007).

8.4 CASO CONFIRMADO DE INFECÇÃO PELO DENV, ZIKV OU CHIKV

O diagnóstico de infecção pelo DENV, ZIKV ou CHIKV foi confirmado pela positividade de pelo menos um dos seguintes métodos:

- a) Dengue: Detecção do antígeno viral NS1 e Detecção do RNA viral por RT-PCR. Devido à reatividade cruzada comumente observada entre os *Flavivirus*, a presença de anticorpos anti-DENV da classe IgM não foi considerada para a confirmação de casos positivos de dengue.
- b) Zika: Detecção do RNA viral por RT-PCR
- c) Chikungunya: Detecção do RNA viral por RT-PCR e detecção de anticorpos anti-CHIKV classe IgM (coletado durante a fase aguda ou convalescente).

8.5 CLASSIFICAÇÃO CLÍNICA DOS CASOS CONFIRMADOS

Após confirmação laboratorial, os pacientes positivos para dengue foram classificados de acordo com a OMS (2009) em: i) Febre do Dengue sem sinais de alarme (DSSA) ii) Dengue com sinais de alarme (DCSA) e iii) Dengue Grave (DG) .

Pacientes com diagnóstico confirmado para Zika foram classificados em brandos e graves, de acordo com os critérios de classificação descritos pelo Ministério da Saúde (Cunha *et al* 2016)

Casos confirmados de febre de chikungunya seguiram os critérios de classificação do Ministério da Saúde, 2014.

8.6 PARÂMETROS HEMATOLÓGICOS E BIOQUÍMICOS

Os parâmetros laboratoriais hematológicos (plaquetas, hematócrito, leucócitos, monócitos e linfócitos totais) e os bioquímicos (AST/TGO e ALT/TGP) foram avaliados em todos os pacientes no hospital de origem. Foram coletados até 20 mL de sangue em tubos contendo anticoagulante ou em tubo sem anticoagulante para obtenção do soro.

8.7 ENSAIOS PARA A QUANTIFICAÇÃO DE MEDIADORES INFLAMATÓRIOS (CITOCINAS/QUIMIOCINAS) E FATORES DE CRESCIMENTO.

8.7.1 CARACTERIZAÇÃO DO PERFIL DE PRODUÇÃO DE CITOCINAS E QUIMIOCINAS POR ELISA

Plasma e soro foram separados, aliquotados e armazenados à -70°C para quantificar citocinas e quimiocinas. Os ensaios de ELISA foram utilizados para avaliar o perfil de liberação de citocinas /quimiocinas nos casos com confirmação laboratorial de infecção por arbovírus.

8.7.1.1 *Quantificação de MCP1/CCL2, RANTES/CCL5 e IP10/CXCL10*

Para a quantificação da quimiocina MCP1/CCL2, 100 µL do anticorpo de captura à concentração de 100 µg/mL para MCP1/CCL2 diluídos em PBS pH 7,2, foram adicionados aos poços em placa de 96 poços (Falcon-BD), seguido de incubação por 18h à temperatura ambiente (TA). Ao final da incubação, foram feitas quatro lavagens com solução de lavagem (Tween-20 0,05% em PBS pH 7,2) e então adicionados 200 µL de solução de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2 horas de incubação à TA, foram realizadas 4 lavagens com tampão de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante. As amostras de plasma dos pacientes e controles foram diluídas 10 vezes para a quantificação de MCP1/CCL2 em solução diluente (Tween-20 0,05%, BSA 0,1% em PBS pH7,2). Foram adicionados 100µL das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2 horas à TA. Ao final da incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e, em seguida, adicionados 100µL do anticorpo de detecção na concentração de 0,25µg/mL para o MCP1/CCL2. Após 2 horas de incubação à TA, foram feitas 4 lavagens com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionados 100µL do conjugado Avidina-HRP (*Horseradish Peroxidase*) por poço, diluído 1/2000 em diluente, e então incubado por 30 minutos à TA. Finalmente, 100 µL do substrato 3,3',5,5'-Tetrametilbenzedina (TMB) (Sigma) foram adicionados em cada poço da placa. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro *Expert Plus* a 620 nm. Os protocolos seguidos para a quantificação das quimiocinas RANTES/CCL5 e IP10/CXL10 foram semelhantes ao utilizado para MCP1/CCL2, seguindo as especificações do fabricante. Os kits utilizados seguem descritos na TABELA 1.

8.7.1.2 Quantificação de IL-6, IL-10 e IFN- γ

Para a quantificação das citocinas nos pacientes, 100 μ L do anticorpo de captura à concentração de 100 μ g/mL ou 200 μ g/mL (no caso da IL-10) diluídos em PBS pH 7,2 foram adicionados aos poços numa placa de 96 poços (Falcon-BD) e incubados a 4°C por 18h. Ao final da incubação, foi feita uma lavagem com solução de lavagem (Tween-20 0,5% em PBS pH 7,2) e então adicionados 250 μ L de solução de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2h de incubação à TA, foram realizadas 2 lavagens com tampão de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante. Foram adicionados 50 μ L das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2h à TA. Ao final da incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e, em seguida, adicionados 50 μ L do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 μ g/mL. Após 2 h de incubação à TA, foram feitas 4 lavagens com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionados 100 μ L do conjugado estreptavidina–HRP por poço, diluído 1/5000 em diluente, e então incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Finalmente, 100 μ L do substrato TMB foram adicionados à placa por poço. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro Expert Plus a 620 nm. Os protocolos seguidos para a quantificação das citocinas IL-10 e IFN- γ foram semelhantes ao utilizado para a IL-6, seguindo as especificações do fabricante. Os kits utilizados seguem descritos na TABELA 1.

8.7.1.3 Quantificação de MIF, IL-15 e TNF- α

Para a quantificação da citocina IL-15 nos pacientes, 100 μ L do anticorpo de captura à concentração de 100 μ g/mL diluídos em PBS pH 7,2 foram adicionados aos poços numa placa de 96 poços (Falcon-BD) e incubados a 4°C por 18h. Ao final da incubação, foi feita uma lavagem com solução de lavagem (Tween-20 0,5% em PBS pH 7,2) e então adicionados 250 μ L de solução de bloqueio (BSA 5% em PBS pH 7,2) por poço. Após 2h de incubação à TA, foram realizadas 2 lavagens com tampão de lavagem. Curvas padrões foram preparadas através de diluições seriadas do respectivo padrão fornecido pelo fabricante. Foram adicionados 50 μ L das amostras de plasma e das diluições da curva padrão aos poços da placa, que foi incubada por 2h à TA. Ao final da incubação, a placa foi lavada 4 vezes com tampão de lavagem e, em seguida, adicionados 50 μ L do anticorpo de detecção na concentração de 0,25 μ g/mL. Após 2h de incubação à TA, foram feitas 4 lavagens com tampão de lavagem e, posteriormente, adicionados 100 μ L do conjugado estreptavidina–HRP por poço, diluído 1/5000 em diluente, e então incubado por 30 minutos à TA. Finalmente, 100 μ L do substrato TMB foram adicionados à placa por poço. A leitura da densidade óptica das amostras e diluições da curva padrão foi realizada no espectrofotômetro Expert Plus a 620 nm.

Os protocolos seguidos para a quantificação das citocinas TNF α e MIF foram semelhantes ao utilizado para IL-15, seguindo as especificações do fabricante. Os kits utilizados seguem descritos na TABELA 1.

8.7.2 DETECÇÃO DE CITOCINAS E FATORES DE CRESCIMENTO POR LUMINEX

As amostras séricas de fase aguda de gestantes e controles foram armazenados a -70°C para posterior detecção de fatores solúveis utilizando Kit comercial para a detecção de 27 analitos de acordo com o protocolo do fabricante (*Bio-Plex Panel 27 Plex-Bio-Rad, CA, USA*). Os Fatores solúveis quantificados incluíram: a) Citocinas: IL1RA, IL-6, IL-2, IL-5, IL-10, IL12, IL-7, IL-13, IL-17 A, IL-4, IL-1 β , IL-9, IL-15, IFN- γ e TNF- α ; b) Quimiocinas: IL-8, MIP1 β , RANTES/CCL5, eotaxina, IP10/CXCL10, MCP1/CCL2, MIP1 α ; c) Moléculas de adesão e fatores de crescimento: G-CSF (Fator estimulador de colônias de granulócitos), *basic-FGF* (Fator de crescimento de fibroblastos), VEGF (Fator de crescimento endotelial vascular), PDGF-BB (Fator de crescimento derivado das plaquetas), GM-CSF (Fator estimulador de colônias de macrófagos e granulócitos).

O imunoenensaio de detecção multiplex Luminex consiste na detecção de vários fatores solúveis simultaneamente numa única amostra utilizando microesferas específicas para cada fator. Assim, microesferas de propriedades espectrais definidas são conjugadas aos anticorpos de captura específicos. Microesferas, padrões, controles fornecidos pelo kit e as amostras dos pacientes foram plaqueadas (placa de 96 poços), com filtro no fundo de cada poço, seguido de incubação por 2 h com agitação. Após incubação, a placa foi lavada utilizando sistema a vácuo e foi adicionado em cada poço, mistura de anticorpos biotinilados de detecção para cada microesfera seguido de incubação de 1h à TA. Após várias lavagens, a reação foi seguida adicionando estreptavidina conjugada a ficoeritrina (PE) em cada poço e incubadas por 30 min. A reação foi finalizada pela adição de solução *STOP*, fornecida pelo kit, e posteriormente a placa foi lavada. As microesferas foram então ressuspensas em tampão e a leitura da placa foi feita no aparelho *Luminex Instrumentation System* (Luminex, Austin, TX, USA) da plataforma Luminex do IOC.

TABELA 1: Kits de ELISA e Luminex utilizados

Produto	Código Fabricante	Limites de detecção	Fabricante
IFN- γ	900-K27	50-3000 pg/mL	Peprtech
IL-6	900-K16	24-1500 pg/mL	Peprtech
TNF- α	900-K25	16-2000pg/mL	Peprtech
IL-10	900-K21	5-2500 pg/mL	Peprtech
MIF	DY289	30-2000 pg/mL	R&D Systems
MCP1/CCL2	900-K31	4-250 pg/mL	Peprtech
RANTES/CCL5	900-M33	16-2000pg/mL	Peprtech
IP10/CXL10	900-T39	1-125 pg/mL	Peprtech
Human IL-15 duoset	DY247	15-1000 pg/mL	R&D Systems
Luminex	Bioplex panel 27	-	Bio-Rad

6.1 ANÁLISES ESTATÍSTICAS:

Os dados clínicos e laboratoriais foram registrados num banco de dados no programa EpiData Versão 3.1. As diferenças das médias foram comparadas utilizando o teste não paramétrico de Mann-Whitney U para dois grupos e o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis*, com o pós-teste de comparação de *Dunn* ou o pós-teste de tendência linear, na comparação de três ou mais grupos. A avaliação da frequências dos sinais e/ou sintomas foi realizada através do teste exato de Fisher. As análises de correlação foram feitas através do teste de *Spearman*. Foi utilizado o *software GraphPad Prism v.6* (GraphPad). Valores de $p \leq 0,05$ foram considerados estatisticamente significativos.

V. RESULTADOS

9. POPULAÇÃO DO ESTUDO

9.1 DIAGNÓSTICO LABORATORIAL DE INFECÇÃO POR ARBOVÍRUS

No ano de 2016 foram coletadas 134 amostras de sangue de pacientes com suspeita clínica de infecção por arbovírus em Campo Grande, MS. O diagnóstico laboratorial diferencial foi realizado através da pesquisa do RNA viral nas 134 amostras coletadas. Desta forma, amostras séricas foram testadas quanto a infecção pelo ZIKV (Lanciotti et al 2008), pelo DENV (Lanciotti et al 1992, Jonhson 2007), CHIKV (Lanciotti et al 2007) e MAYV (Coimbra et al 2007). Dos 134 casos, 107 (107/134, 79%) apresentaram diagnóstico de infecção pelo DENV e/ou ZIKV. Vinte por cento das amostras analisadas (27/134; 20,1%) foram negativas para todas as metodologias aplicadas (sorológicas e moleculares) e foram usadas nas análises posteriores como grupo de pacientes negativos para DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV e classificados como outras doenças febris (ODF). (FIGURA 17).

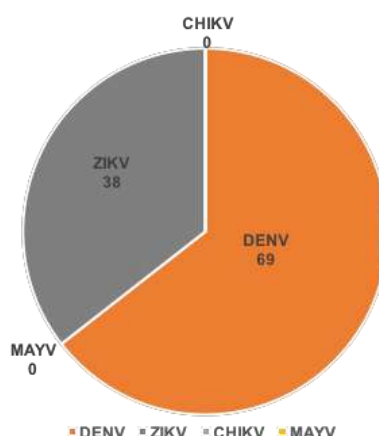


FIGURA 17: Diagnóstico molecular diferencial de casos suspeitos de infecção pelos arbovírus DENV e/ou ZIKV. Para a investigação de casos suspeitos as amostras foram testadas para o DENV através da PCR convencional (Lanciotti et.al 1992); e com protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Johnson *et al.* (2005); casos suspeitos de infecção pelo ZIKV pela metodologia de RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti *et al.* (2008). Para investigação de alfavírus, a RT-PCR para detecção do CHIKV descrito por Lanciotti et. al (2007), o kit Simplexa™ CHIKV (*Focus Diagnostics, California, EUA*) e para investigação de casos suspeitos de MAYV o protocolo de Coimbra *et al.* 2007.

Desta forma, tivemos em nosso estudo 107 pacientes com diagnóstico positivo de dengue (69/134; 51,4%) e/ou Zika (38/134; 28,3%) na fase aguda da doença [mediana (IC95%): 4 dias (3,5-5,2)]. Não houve diferença significativa em relação ao sexo dos pacientes incluídos (53 mulheres vs 54 homens); e a idade média foi de 34 anos. Dados demográficos, clínicos e laboratoriais dos diferentes grupos de pacientes incluídos neste estudo são mostrados na TABELA 2.

TABELA 2: Características demográficas e parâmetros laboratoriais do pacientes estudados durante a tripla epidemia em Campo Grande, MS, Brasil, 2016

	ZIKV ^o	DENV	CHIKV [£]	NEGATIVO ^φ
	(n = 38)	(n = 69)	(n = 7)	(n = 27)
Idade	31 (30,5-40,1)	32 (32,7 – 40,3)	26 (17,5-53,8)	38 (32,1-44,3)
Gênero				
Feminino: Masculino (n)	21:17	32:37	2:5	22:6
Gestantes (n)	5	5	0	1
Dias pós-infecção ^a	3,5 (3-4,1)	4,0 (4,1- 6,2)	3.0 (1,9 – 4,9)	3.0 (1,3- 5,7)
Hospitalização, n (%)	2 (0,9)	7 (5,22)	1 (0,9)	0
Comorbidades				
Hipertensão arterial, n (%)	8 (7,5)	12 (11,5)	2 (1,8)	1 (0,9)
Diabetes mellitus, n (%)	0	2 (1,8)	2 (1,8)	0
Outras Comorbidades [#] , n (%)	9 (8,4)	19 (17,9)	1 (0,9)	8 (7,5)

^oNúmero total de amostras/casos positivos independente da presença de co infecção.

^φ Pacientes negativos para todas as metodologias aplicadas;

[£] Pacientes que apresentaram anticorpos anti -CHIKV da classe IgM

^aDias desde o início da doença até a entrevista;

[#]Outras comorbidades incluem rinite, asma brônquica, sinusite e artrite reumatóide;

Os dados são apresentados como medianas (intervalo interquartil) ou números (n) com porcentagem (%).

A análise dos resultados demonstrou que das 134 amostras testadas, trinta (30/134; 22,4%) apresentaram anticorpos anti- DENV da classe IgM. O antígeno NS1 de dengue foi detectado em 37,3% (50/134) dos casos. Adicionalmente, 5,2% (7/134) dos pacientes tinham anticorpos anti-CHIKV da classe IgM. Todas as amostras foram submetidas ao diagnóstico molecular diferencial. A RT-PCR para DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV foi utilizada para a pesquisa dos vírus. Sessenta e nove amostras (69/134; 51,4%) foram positivas para DENV e trinta e oito amostras (38/134; 28,3%) foram positivas para ZIKV. Conforme demonstrado na TABELA 3, sessenta e dois pacientes apresentaram infecção pelo DENV-1 (62/69; 89,8%) e apenas sete pelo DENV-4 (7/69; 10,1%).

Uma vez que vírus Mayaro (MAYV) pertence ao gênero *Alfavírus* e juntamente com CHIKV circulam no Brasil, todas as amostras foram testadas pelo RT-PCR MAYV Nenhuma amostra foi positiva para CHIKV ou para MAYV pelo método molecular.

TABELA 3. Diagnóstico Laboratorial para casos suspeitos de infecção por arbovírus (n=134) analisados na epidemia ocorrida em 2016 em Campo Grande, MS, Brasil.

Métodos Laboratoriais	Positivo (%)
ELISA IgM Dengue [∞]	30 (22,3)
ELISA NS1 Dengue	50 (37,3)
ELISA IgM CHIKV	7 (5,6)
RT-PCR para a detecção do DENV [£]	69 (51,4)
DENV-1	62 (89,8)
DENV-4	7 (10,1)
RT-PCR para a detecção do ZIKV	38 (28,3)
RT-PCR para a detecção do CHIKV	0
RT-PCR para a detecção do MAYV	0

[∞]Para investigação de infecção por dengue, as amostras foram testadas para DENV através da presença de anticorpos anti-DENV classe IgM. Foram utilizados o *kit Panbio dengue IgM Capture ELISA (Alere™, Brisbane, Austrália)*, o *Dengue Virus IgM Capture DxSelect™ (Focus Diagnostics, California, EUA)*. Para a investigação da presença da proteína NS1 foi utilizado o *kit ELISA Platelia™ Dengue NS1 Ag-ELISA (BioRad Laboratories, California, EUA)*. Na investigação de casos suspeitos de infecção pelo CHIKV, as amostras foram submetidas às metodologias sorológicas para o diagnóstico de CHIKV pelo teste “padrão-ouro” ELISA de captura de IgM anti-CHIKV de acordo com o protocolo preconizado pelo (MS,2014), e pelo Anti-CHIKVELISA IgM (Euroimmun, Lubeck, Alemanha). [£] Protocolos de PCR convencional do DENV (Lanciotti *et al.* 1992) Simplexa™ TM Dengue Real Time RT-PCR e RT-PCR Johnson *et al.* ,2005. Para investigação de casos suspeitos de infecção pelo ZIKV, as amostras foram testadas para ZIKV pela metodologia de RT-PCR em tempo real descrita por Lanciotti *et al.* (2008), RT-PCR para detecção do CHIKV descrito por Lanciotti *et al.* (2007) e o *kit Simplexa™™ CHIKV (Focus Diagnostics, California, EUA)*. Detecção do RNA viral do vírus Mayaro (Mayaro vírus-MAYV) gênero *Alfavirus* de acordo com o protocolo de Coimbra *et al.* 2007. Resultados apresentados sem levar consideração a presença de coinfeção.

9.1.1 COINFEÇÕES

Após análise dos resultados da RT-PCR, observamos que dezoito (18/134; 13,4%) dos casos suspeitos analisados apresentaram coinfeção pelo DENV e ZIKV. Cinquenta e um pacientes apresentaram monoinfecção pelo DENV (51/69; 38,1%) e dezoito apresentaram monoinfecção pelo ZIKV (18/38; 13,4%) (FIGURA 18). Duas amostras positivas através da RT-PCR de ZIKV, e negativas para a RT-PCR de DENV, apresentaram teste positivo para proteína não estrutural NS1, sugerindo possível coinfeção pelo DENV. Estas amostras foram excluídas das futuras análises

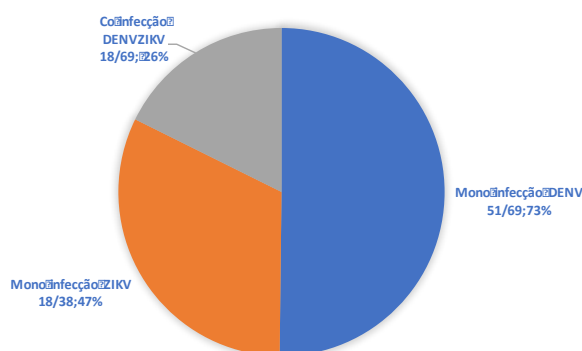


FIGURA 18: Percentual de monoinfecção pelo DENV (51/69, 73,9%) ou pelo ZIKV (18/38, 47,3%) e coinfeções entre DENV e ZIKV (18/69, 26%). Na análise foram considerados apenas amostras positivas através da RT-PCR. Amostras positivas através da RT-PCR de ZIKV, negativas para a RT-PCR de DENV, CHIKV e MAYV com teste positivo para proteína não estrutural NS1 foram excluídas da análise (n=2).

Os nossos resultados demonstraram que o sorotipo DENV-1 foi o sorotipo infectante predominante entre os pacientes mono infectados com DENV e também nos co infectados pelo DENV e ZIKV (45/51; 88,2% e 17/18; 94,4%, respectivamente) seguido pelo DENV-4 (6/51; 11,8% e 1/18; 5,5%, respectivamente) (FIGURA 19).

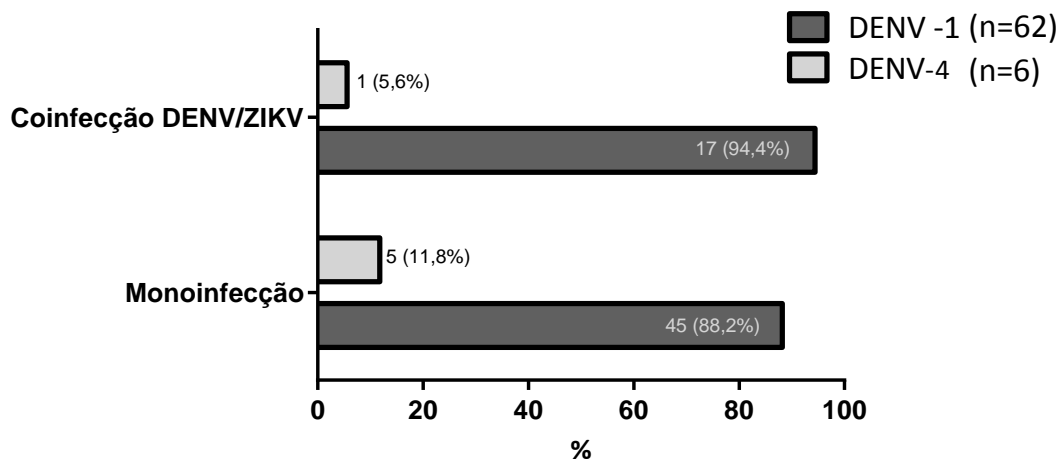


FIGURA 19: Frequência dos sorotipos DENV-1 e DENV-4 nos pacientes mono infectados pelo DENV e co infectados com ZIKV/DENV. Na análise foram consideradas apenas amostras positivas através da RT-PCR.

Nosso próximo passo foi a análise dos valores de CT (*Cycle Treshold* - Limiar de Ciclo) por RT-PCR. O valor do CT é proporcional ao logaritmo da quantidade inicial de expressão do gene alvo numa dada amostra. Quanto menor for o valor inicial do CT obtido, maior amplificação e expressão genômicas. No contexto do diagnóstico destas arboviroses, o CT pode ser considerado uma medida indireta da carga viral. Conforme demonstrado na FIGURA 20, nossos resultados demonstraram que os valores de CT nos casos mono infectados pelo DENV variaram de 22,3 a 40,0; enquanto que nos pacientes mono infectados pelo ZIKV os valores variaram de 31,3 a 38,2; Nos pacientes co infectados DENV/ZIKV, os valores variaram de 25,4 a 38,5. Embora alguns pacientes co infectados DENV/ZIKV tenham apresentado baixos valores de CT, comparados aqueles mono infectados pelo DENV ou ZIKV, essa diferença não foi estatisticamente significativa.

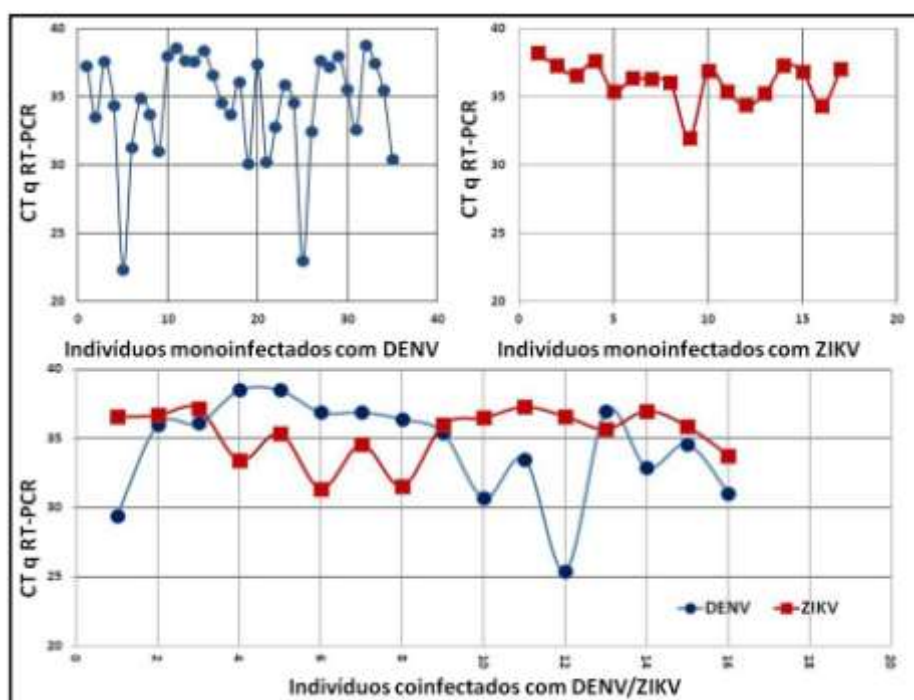


FIGURA 20: Valores de CT por RT-PCR em tempo real para os casos de DENV, ZIKV e DENV/ZIKV.

A análise dos testes sorológicos demonstrou que doze (12/51; 23,5%) dos pacientes mono infectados pelo DENV apresentaram anticorpos anti-DENV da classe IgM. Ainda, três (3/18; 16,7%) pacientes co infectados com DEN/ZIKV e um paciente mono infectado com ZIKV apresentaram anticorpos IgM (TABELA 4).

Em relação à quantificação da proteína NS1, a porcentagem de detecção de NS1 foi significativamente mais elevada nos pacientes mono infectados pelo DENV comparados aos pacientes mono infectados pelo ZIKV (39/51; 76,54% vs. 2/20; 10,0%, respectivamente). Da mesma forma, amostras de pacientes co infectados DENV/ZIKV apresentaram maior taxa de detecção de NS1 (9/18; 50,0% vs. 2/20; 10,0%, respectivamente) (TABELA 4).

TABELA 4: Frequência de anticorpos anti-DENV da classe IgM e da proteína NS1 circulantes em pacientes apresentando DENV, ZIKV ou co infectados ZIKV/DENV.

	DENV mono infecção	ZIKV mono infecção	DENV/ZIKV co infecção
IgM	12/51 (23,5%)	1/20 (5,0%)	3/18 (16,7%)
NS1	39/51 ^{&} (76,5%)	2/20 (10,0%)	9/18 ^{&} (50,0%)

Os anticorpos anti-DENV classe IgM foram dosados através do ELISA (*IgM Capture DxSelect*) e a proteína NS1 através do kit *platelia Dengue NS1 test* nos pacientes com diagnóstico molecular positivo (RT-PCR) de infecção pelo DENV, ZIKV ou co infectados com ambos vírus.[&] Análise estatística através do *Teste exato de Fisher*: grupo mono infectado pelo DENV vs mono infectado pelo ZIKV $p=0.0001$; Co infectado DENV/ZIKV vs. grupo mono infectado pelo ZIKV $p=0.0113$

Finalmente, observamos que dos sete pacientes que apresentaram anticorpos específicos anti-CHIKV da classe IgM, três destes também foram positivos para DENV-1 e um foi concomitantemente positivo para DENV e ZIKV.

9.2 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS E CLÍNICOS: CARACTERIZAÇÃO POR LOCALIZAÇÃO GEOGRÁFICA DOS PACIENTES

Foi possível estabelecer a procedência dos casos analisados nesta casuística. Os resultados demonstram que o maior percentual de casos foi identificado na região do Segredo, próximo ao ponto de coleta, UPA Coronel Antonino, TABELA 5.

TABELA 5: Distribuição dos casos confirmados de acordo com a região do Mato Grosso do Sul

	Diagnóstico							Total
	Negativo todas as técnicas	DENV	ZIKV	CHIKV (IgM+)	DENV/ZIKV	DENV/CHIKV IgM+	DENV/ZIKV CHIKV IgM+	
Anhanduizinho	3	1	2	0	0	0	0	6
Bandeira	0	0	0	0	1	0	0	1
Centro	4	6	0	0	2	0	0	12
Imbirussu	0	5	0	0	3	0	0	8
Lagoa	1	3	0	0	1	0	0	5
Prosa	5	4	4	0	1	1	0	16
Segredo	13	50	14	3	10	2	1	85
Zona Rural	1	0	0	0	0	0	0	1
Total	27	69	20	3	18	3	1	134

9.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DE PACIENTES INFECTADOS COM DENV E ZIKV

Pacientes incluídos nesse estudo apresentaram febre acompanhada de um ou mais sintomas tais como mialgia, artralgia, exantema, cefaleia, prostração, hiperemia conjuntival, edema, náusea, vômitos e dor retro orbital.

Uma vez os pacientes do nosso estudo foram positivos para infecção por DENV ou ZIKV, uma comparação de sinais e sintomas foi realizada, utilizando os seguintes grupos: a) pacientes mono infectados pelo DENV, b) mono infectados pelo ZIKV e c) co infectados pelo DENV e ZIKV. Foram excluídos desta análise as gestantes e casos que apresentaram anticorpos anti-CHIKV da classe IgM. Além disso, dez casos negativos para a RT-PCR de DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV, mas positivos para a detecção da proteína NS1 foram incluídos nas análises como pacientes mono infectados pelo DENV.

Conforme demonstrado na FIGURA 20, os sintomas e sinais foram avaliados nos diferentes grupos de pacientes. Podemos observar que o grupo mono infectado pelo ZIKV foi caracterizado por alta frequência de exantema e prurido, enquanto o grupo mono infectado pelo DENV apresentou maior frequência de vômitos, anorexia e tontura. Os pacientes co infectados com DENV/ZIKV apresentaram menor frequência de exantema e prurido.

A análise estatística demonstrou que os pacientes mono infectados pelo DENV apresentaram maior frequência de prostração (90,7% 49/54 $p=0,0311$) e vômitos (31,4% 17/54 $p=0,0146$). Por outro lado, prurido (86,7% 13/15 $p=0,0181$) e edema 40% 6/15, $p=0,0172$) foram significativamente associados à mono infecção pelo ZIKV

O grupo co infectado DENV/ZIKV apresentou significativamente menor frequência de cefaléia (66,7%; 10/17 $p=0,0101$) em relação ao grupo mono infectado com DENV (88,2%; 45/51) (FIGURA 21). A análise dos sinais e sintomas por gênero demonstrou que edema foi mais frequente nas mulheres (53,3%, 8/15 $p=0,0617$).

9.4 DESFECHO CLÍNICO NOS PACIENTES MONOINFECTADOS PELO DENV E COINFECTADOS DENV/ZIKV

Segundo a classificação clínica da OMS 2009, os casos confirmados de dengue foram organizados em grupos: dengue sem sinais de alarme (DSSA), dengue com sinais de alarme (DCSA) e dengue grave (DG). De acordo com a análise de cinquenta e quatro pacientes mono infectados pelo DENV, quarenta e seis apresentaram DSSA, sete apresentaram DCSA e um caso apresentou DG. Dentre os pacientes co infectados, doze apresentaram DSSA, três apresentaram sinais de alarme sendo classificados como DCSA/DG (TABELA 6). Os sinais de alarme mais frequentes foram hepatomegalia, sangramento de mucosa, dor abdominal e aumento do hematócrito com rápida queda da contagem das plaquetas.

Manifestações clínicas associadas à gravidade da dengue tais como, extravasamento plasmático, hemorragias graves (gastrointestinal) ou comprometimento de órgãos (comprometimento renal, cardíaco ou neurológico) não foram observados nos pacientes mono infectados pelo DENV ou co infectados DENV/ZIKV. Pacientes mono infectados e apresentando DCSA/DG apresentaram maior frequência de metrorragia e epistaxe comparados com pacientes co infectados pelo DENV/ZIKV [(6/8; 75% vs. 3/15; 20% $p=0,0017$ pelo teste exato de Fisher, respectivamente] e com pacientes mono infectados pelo ZIKV [(6/8;75% vs. 0/15 $p=0,0003$ pelo teste exato de Fisher, respectivamente)].

Sete pacientes mono infectados pelo DENV foram hospitalizados e receberam hidratação parenteral. Apenas um paciente apresentou DG e recebeu transfusão de sangue com concentrado de plaquetas. Todos os pacientes acompanhados nesse estudo receberam alta hospitalar e não houve casos fatais.

Não foram observadas nos grupos de pacientes estudados manifestações clínicas relacionadas com mal prognóstico da infecção pelo ZIKV, tais como SGB ou outras complicações neurológicas. Apenas um paciente co infectado foi hospitalizado devido a desorientação, visão turva e dificuldades na audição. Nenhum paciente infectado pelo ZIKV precisou receber hidratação parenteral.

TABELA 6: Características clínicas e demográficas dos pacientes de acordo com o tipo de infecção durante a tríplice epidemia ocorrida em Campo Grande, MS, Brasil, 2016.

Características clínicas e Demográficas	TIPO DE INFECÇÃO				
	DENV		DENV/ZIKV		ZIKV
	DSSA (n=46)	DCSA/DG (n=8)	DSSA (n=12)	DCSA/DG (n=3)	(n=15)
Gênero F:M	22:24	6:2	5:7	1:2	12:3
Idade (Mediana - LCI-LCS)	33 (28-42)	46,5 (17-88)	29 (19-55)	21 (19-49)	40 (28-46)
^a Dias de Infecção ^Ω (Mediana -LCI-LCS)	4 (3-5)	4,5 (1-22)	3 (2-4)	5 (4-8)	3 (2-4)
DENV-1 (n/total)	33/38	5/6	12/13	3/3	0
DENV-4 (n/total)	4/38	1/6	1/13	0/3	0
Hospitalização (%)	0	7 (12.9%)	0	2 (13.3%)	1(6.6%)
Contagem das plaquetas 10 ³ /mm ³	198,5 (157-212)	101 (12-221) ^{b+++}	190 (137-247) ^{c+}	193 (160-296)	197 (143-246) ^{c+}
Sangramentos (%) ^d	0	6 (75%) ^d	1 (7,14%) ^b	2 (66%)	0

^a Dias de infecção corresponde ao período dentre o dia do início de qualquer sintoma até o momento em que o paciente foi entrevistado; n corresponde ao número total de pacientes analisados; ^Ω ((LCI) Limite de confiança inferior; (LCS) Limite de confiança superior -95% Intervalo de confiança da mediana;

^b representa diferença estatística entre DSSA vs. DCSA/DG; ^c representa diferença estatística entre pacientes mono infectados pelo DENV com DCSA/DG vs. pacientes co infectados com DSSA e vs. pacientes mono infectados pelo ZIKV; ^d sangramentos: metrorragia, epistaxe e gengivorragia. Foi aplicado o teste T *Mann-Whitney*; Gestantes e pacientes que apresentaram anticorpos anti-CHIKV classe IgM não foram incluídos na análise. ⁺ P < 0,01 ⁺⁺ P < 0,001 ⁺⁺⁺ P < 0,0001. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

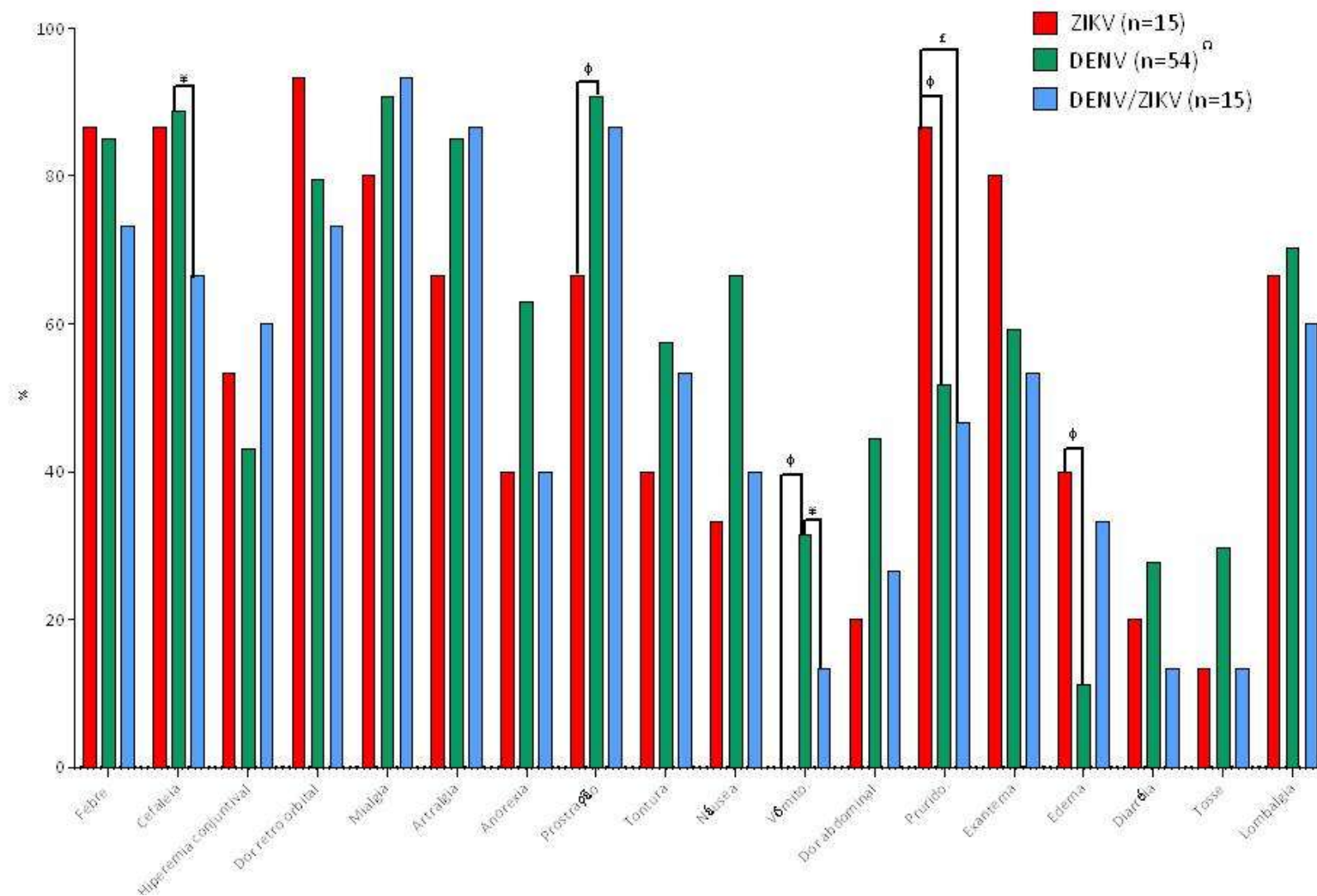


FIGURA 21. Sinais e Sintomas de pacientes mono infectados pelo ZIKV e DENV e co infectados por DENV/ZIKV, Campo Grande, MS, 2016. ^Ω10 pacientes com resultados negativos no RT-PCR para DENV, ZIKV and CHIKV, porém com resultado positivo para NS1 foram considerados como mono infectados para DENV nas análises. * p<0.05 representa diferença estatística entre DENV vs DENV/ZIKV; ‡ p<0.05 representa diferença estatística entre ZIKV vs DENV/ZIKV. † p<0.05 representa diferença estatística entre ZIKV vs DENV; Gestantes e pacientes com resultado positivo para IgM de CHIKV não foram incluídos nesta análise. Foram realizados os testes de Fisher e Yates quando indicado para análise univariada, utilizando o *Prism 6 Statistics* (Graphpad, EUA). * Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

9.5 CARACTERÍSTICAS LABORATORIAIS DIFERENCIAIS

A contagem de plaquetas e valores do hematócrito são parâmetros utilizados na avaliação da gravidade da dengue e também como diagnóstico diferencial. Para análise dos parâmetros hematológicos e bioquímicos utilizamos os grupos: DENV, ZIKV, DENV/ZIKV e indivíduos negativos para DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV, ou seja, pacientes apresentando outras doenças febris (ODF).

Não observamos diferenças nos valores percentuais do HT entre os diferentes grupos de pacientes analisados. No entanto, nossos resultados demonstraram que pacientes mono infectados pelo DENV apresentaram menor contagem de plaquetas quando comparados com o grupo de pacientes ODF [DENV $196 (157-209) \times 10^3/\text{mm}^3$ vs. ODF $222 (182-247) \times 10^3/\text{mm}^3$, respectivamente]. Além disso, entre os pacientes mono infectados pelo DENV, 16,6% (9/54) apresentaram contagem de plaquetas $\leq 100.000/\text{mm}^3$, enquanto que todos os mono infectados com ZIKV e co infectados com DENV/ZIKV tiveram contagens de plaquetas $\geq 100.000/\text{mm}^3$ (FIGURA 22).

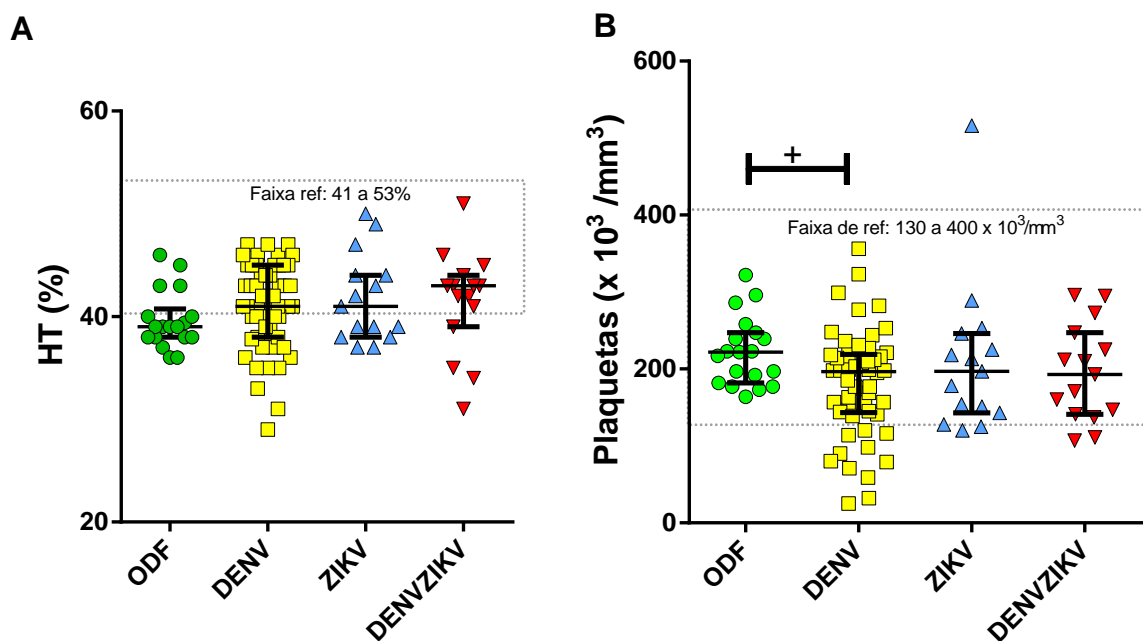


FIGURA 22: Valores percentuais de Hematócrito (A) e Contagem de plaquetas(B) em pacientes mono infectados pelo DENV($n=54$), ZIKV($n=15$), co infectados com DENV e ZIKV ($n=15$) e ODF ($n=19$). Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa *GraphPad Prism* v.6. As linhas horizontais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25% - 75%). As linhas tracejadas representam as faixas de referência: Hematócrito: (41 a 53%); Plaquetas: ($130.000-400.000/\text{mm}^3$). + $P < 0,01$ ** $P < 0,001$ *** $P < 0,0001$. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

Pacientes monoinfectados com DENV e monoinfectados com ZIKV tiveram contagens de leucócitos mais baixas em comparação com o grupo ODF [DENV 4400 (3700-5500)/mm³; ZIKV 4400 (3900-5300) /mm³ vs. ODF 6200 (5000-7600) /mm³, respectivamente].

Observamos que os pacientes monoinfectados com DENV tendem a apresentar menores contagens de linfócitos. No entanto, a análise estatística demonstrou que somente pacientes monoinfectados com ZIKV ou coinfectados com DENV/ZIKV apresentaram menores contagens de linfócitos quando comparados com o grupo ODF [ZIKV 1330 (1000-2120) /mm³; DENV/ZIKV 1136 (858-2368) /mm³ vs. ODF 1881 (1575-2500) /mm³ respectivamente]. A população monocítica não apresentou diferença estatística entre os grupos (FIGURA 23)

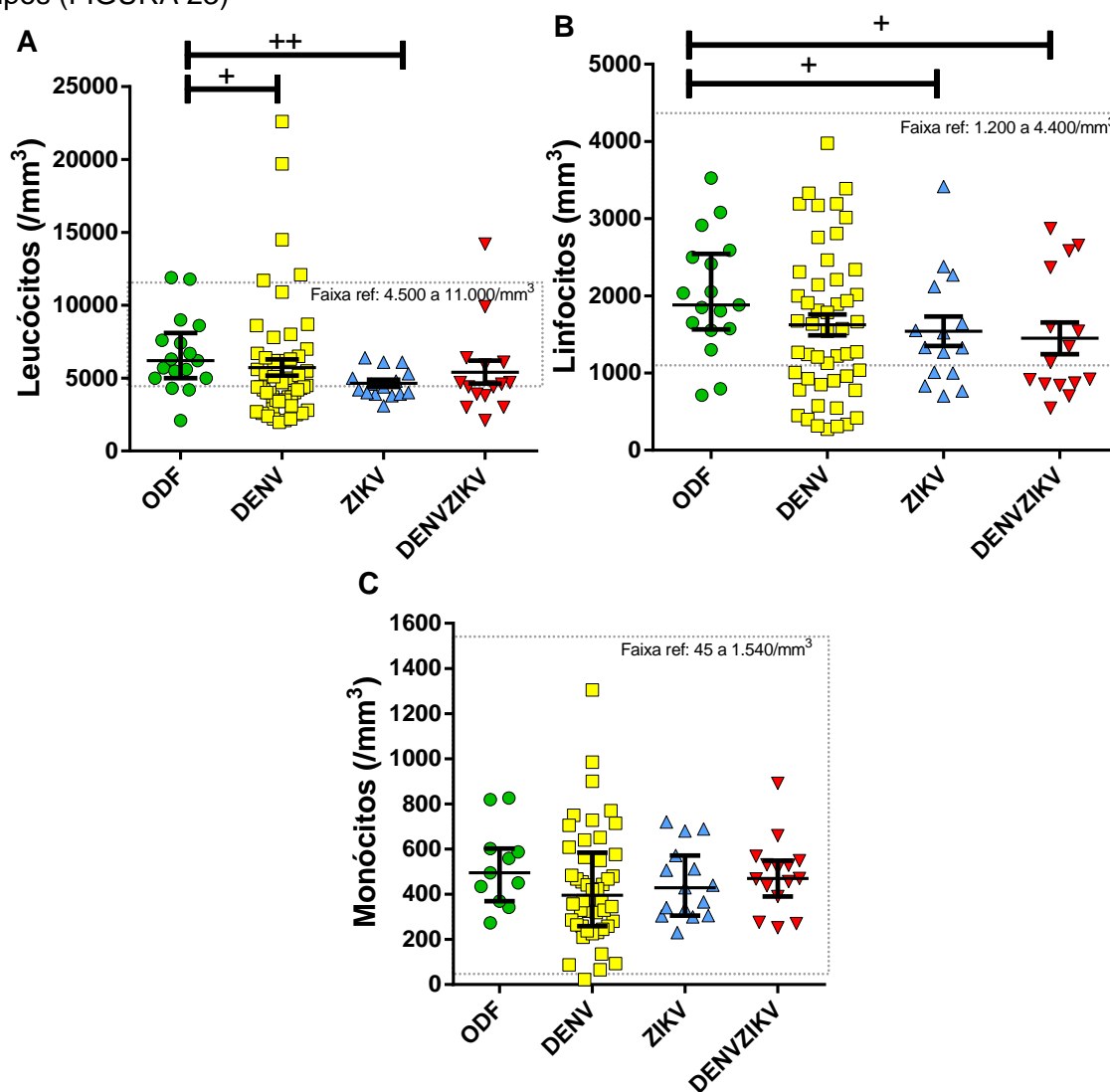


FIGURA 23. Contagem de leucócitos (A), linfócitos (B) e monócitos (C) em pacientes monoinfectados pelo DENV (n=53), ZIKV(n=15), coinfectados com DENV/ZIKV (n=15) e ODF (n=17). Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa *GraphPad Prism* v.6. As linhas horizontais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25% – 75%). As linhas tracejadas representam as faixas de referência: Leucócitos: (4500 a 11.000/mm³); Linfócitos: (1200 a 4400/mm³); Monócitos: (45 a 1540/mm³). + P < 0,01 ++ P < 0,001 *** P < 0,0001. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

Em relação às enzimas hepáticas, observamos que os grupos mono infectado pelo DENV e co infectado DENV/ZIKV apresentaram maiores níveis circulantes de AST/TGO quando comparados com grupo ODF [DENV 36,5 (26-57) U/L; DENV/ZIKV 23 (20-42) U/L vs. ODF 18 (14-21) U/L, respectivamente]. Da mesma forma, os pacientes mono infectados com DENV apresentaram níveis mais elevados de ALT/TGP comparados com os mono infectados com ZIKV e com ODF [DENV 32 (23-43) U/L ; ZIKV 23 (17-31) U/L vs. ODF 16 (12-22) U/L respectivamente] (FIGURA 24).

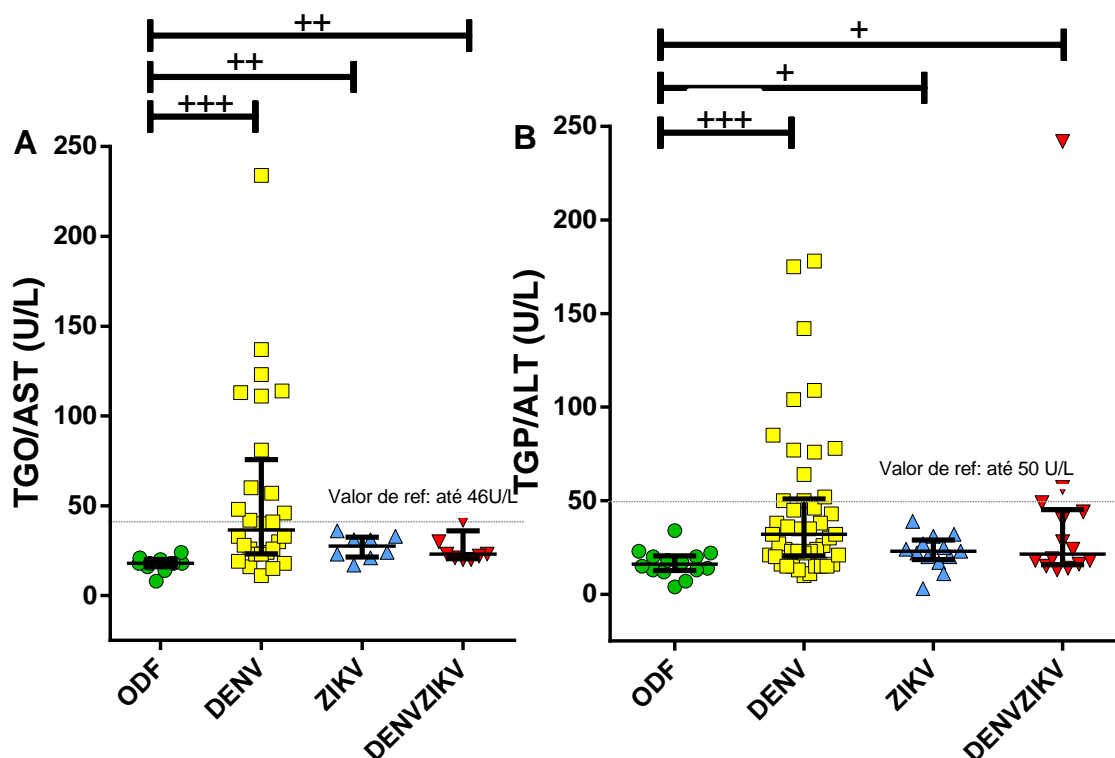


FIGURA 24: Quantificação de enzimas hepáticas nos diferentes grupos de estudo. (A) TGO/AST em pacientes mono infectados pelo DENV (n=28), ZIKV(n=8), co infectados com DENV/ZIKV (n=9) e ZIKV e ODF(N=11). (B): TGP/ALT em pacientes mono infectados pelo DENV (n=32), ZIKV(N=13), co infectados com DENV e ZIKV(n=14) e ODF (n=14). Para a análise estatística foi realizado o teste não paramétrico de Mann-Whitney, utilizando o programa *GraphPad Prism* v.6. As linhas horizontais representam a mediana do grupo e as verticais a variação interquartil (25% – 75%). As linhas tracejadas representam os valores de referência: TGO/AST: até 46 U/L; TGP/ALT: até 50 U/L. + P < 0,01 ++ P < 0,001 +++ P < 0,0001. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

10. QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS E CITOCINAS

O aumento significativo de mediadores inflamatórios solúveis é um evento descrito na dengue como “tempestade de citocinas” e tem sido relacionado com casos graves de dengue (Srikiatkachorn & Green, 2010). Até o momento, pouco se sabe sobre o papel destes mediadores na infecção pelo ZIKV e sua importância nas formas clínicas da doença assim como em pacientes coinfectados. Desta forma, um dos nossos objetivos foi quantificar citocinas (TNF- α , IL-6, IFN- γ , IL-15, IL-10) e quimiocinas (MCP-1, RANTES/CCL5, IP-10/CXCL10 e MIF). Para isto, utilizamos quatro grupos de estudo: Grupo controle com doadores clinicamente saudáveis, pacientes monoinfectados pelo DENV, monoinfectados pelo ZIKV e coinfectados DENV/ZIKV (FIGURAS 25 e 26).

Observamos níveis circulantes significativamente aumentados de TNF- α nos pacientes monoinfectados com DENV, nos pacientes monoinfectados com ZIKV e também nos paciente coinfectados com DENV/ZIKV, em relação ao grupo controle [Grupo controle (n=27): 8,01 pg/mL (7,05-8,8 pg/mL); DENV (n=29): 13,45 pg/mL (9,4-15,8 pg/mL); ZIKV (n=11): 11,3 pg/mL (9,4-16,7 pg/mL); DENV/ZIKV (n=14): 14,3 pg/mL (11,3-24,5 pg/mL)]. Maiores níveis circulantes de TNF- α foram observados nos paciente com coinfeção DENV/ZIKV (FIGURA 25A).

Observamos níveis circulantes significativamente aumentados de IL-6 nos pacientes monoinfectados com DENV e nos pacientes coinfectados com DENV/ZIKV, em relação aos controles [317 (147-638) pg/mL n=9; DENV 842 (655-1147) pg/mL n=29; ZIKV 888 (591-1147) pg/mL n=9; DENV/ZIKV 1280 (296-1993) pg/mL n=11)]. Da mesma forma, maiores níveis circulantes de IL-6 foram observados nos pacientes coinfectados (FIGURA 25B).

Em relação aos níveis circulantes de IFN- γ , nossos resultados demonstram maiores níveis nos pacientes monoinfectados pelo dengue em relação aos controles [317 (147-638) pg/mL n=9; DENV 842 (655-1147) pg/mL n=29; ZIKV 888 (591-1147) pg/mL n=9; DENV/ZIKV 1280 (296-1993) pg/mL n=11)]. (FIGURA 25C).

Similarmente, maiores níveis circulantes de IL-15 foram encontrados nos pacientes monoinfectados pelo DENV em comparação com os controles [controles 0,1 (0,1-3,3) pg/mL n=10; DENV 8,7 (1,4-21,5) pg/mL n=12; ZIKV 0,9 (0,1-21,5) pg/mL n=21; DENV/ZIKV 3,4 (0,1-30,18) pg/mL n=15)] (FIGURA 25D).

Não foi observada diferença estatística na produção da IL10 nos diferentes grupos de pacientes estudados [controles 0,1 (0,1-0,1) pg/mL n=7; DENV 184,2 (0,1-511) pg/mL n=11; ZIKV 136 (0,1-416) pg/mL n=20; DENV/ZIKV 0,1 (0,1-117) pg/mL n=13)] (FIGURA 25E).

Em relação às quimiocinas, maiores níveis circulantes de IP10/CXCL10 foram observados nos pacientes mono infectados pelo DENV, nos mono infectados pelo ZIKV e também nos pacientes co infectados em relação aos controles [controles 2,6 (0,1-8,02) pg/mL n=10; DENV 23,24 (5,4-34,3) pg/mL n=10; ZIKV 21,1 (18,4-25,4) pg/mL n=20; DENV/ZIKV 24,09 (21,2-33,13) pg/mL n=15)]. Maiores níveis de IP10/CXCL10 foram encontrados nos pacientes co infectados (FIGURA 26A).

Da mesma forma, observamos maiores níveis circulantes de MCP1/CCL-2 nos pacientes mono infectados com DENV, nos pacientes mono infectados com ZIKV e também nos paciente co infectados com DENV/ZIKV, todos em relação aos controles [controles 14,8 (11,9-17,4) pg/mL n=10; DENV 56,2 (14,9-113) pg/mL n=11; ZIKV 35,03 (20-49,7) pg/mL n=21; DENV/ZIKV 37,8 (24,4-108,1) pg/mL n=12)]. (FIGURA 26B).

Os pacientes co infectados com DENV/ZIKV apresentaram menores níveis circulantes de RANTES/CCL-5 quando comparados com os controles [controles 4872 (2435-6511) pg/mL n=10; DENV 3430 (3053-4275) pg/mL n=11; ZIKV 3897 (2775-4572) pg/mL n=20; DENV/ZIKV 2826 (1727-3474) pg/mL n=15)]. (FIGURA 26C).

Não foi observada diferença estatística na produção da MIF nos grupos de pacientes estudados [controles 129,5 (8,1-233) pg/mL n=10; DENV 49,3 (15,08-108) pg/mL n=12; ZIKV 39,8 (23,7-108) pg/mL n=21; DENV/ZIKV 25,16 (17,4-101,7) pg/mL n=15)] (FIGURA 26D).

10.1 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS POR ELISA

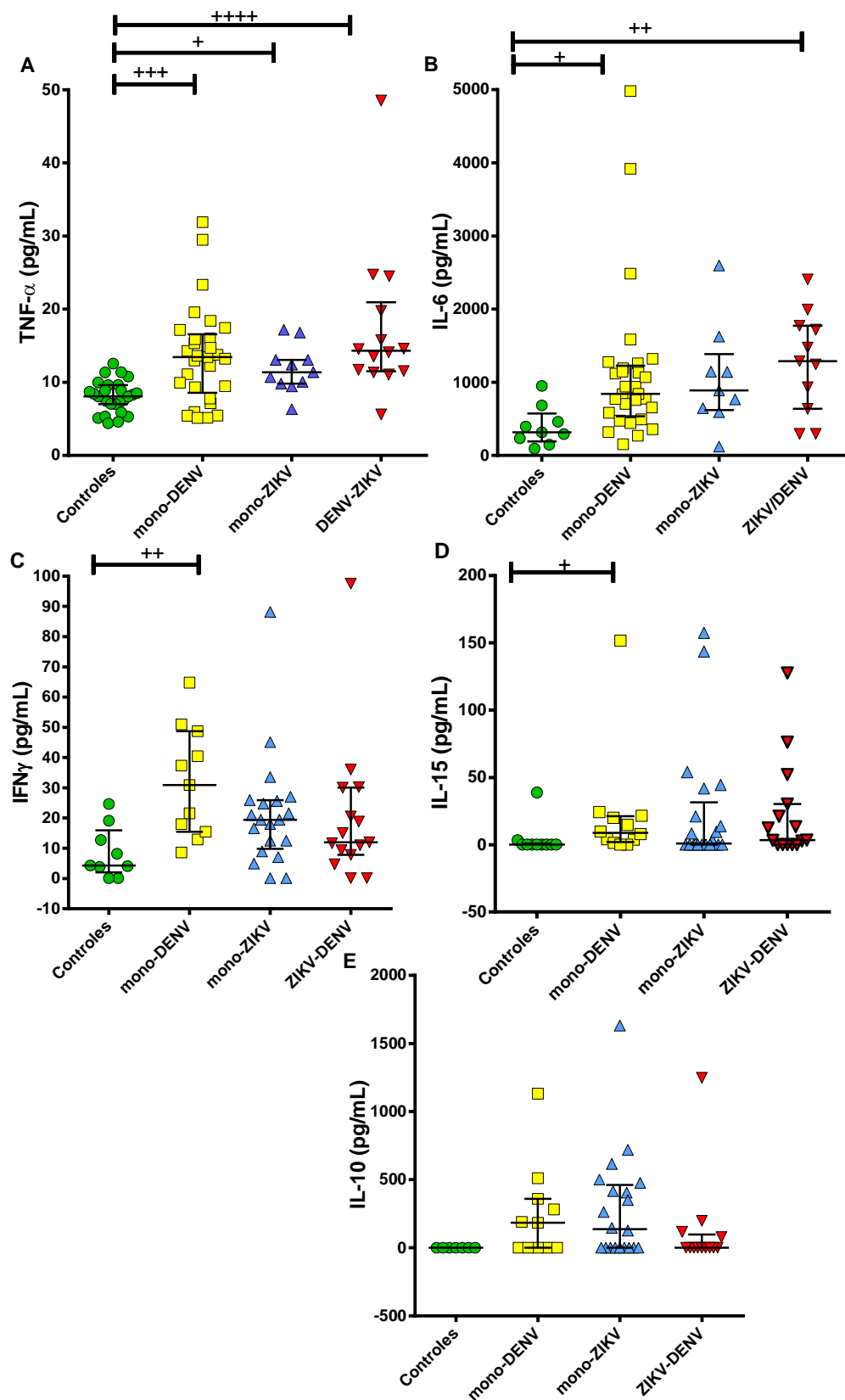


FIGURA 25: Quantificação de citocinas circulantes em pacientes mono infectados pelo DENV, mono infectados pelo ZIKV ou co infectados com DENV/ZIKV. A quantificação das citocinas TNF- α (A), IL-6 (B), IFN- γ (C) e IL-1 β (D), em controles e nos diferentes grupos. Na análise estatística foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* com o pós-teste de comparação de *Dunn*. + P < 0,01 ++ P < 0,001 +++ P < 0,0001. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

10.2 QUANTIFICAÇÃO DE QUIMIOCINAS POR ELISA

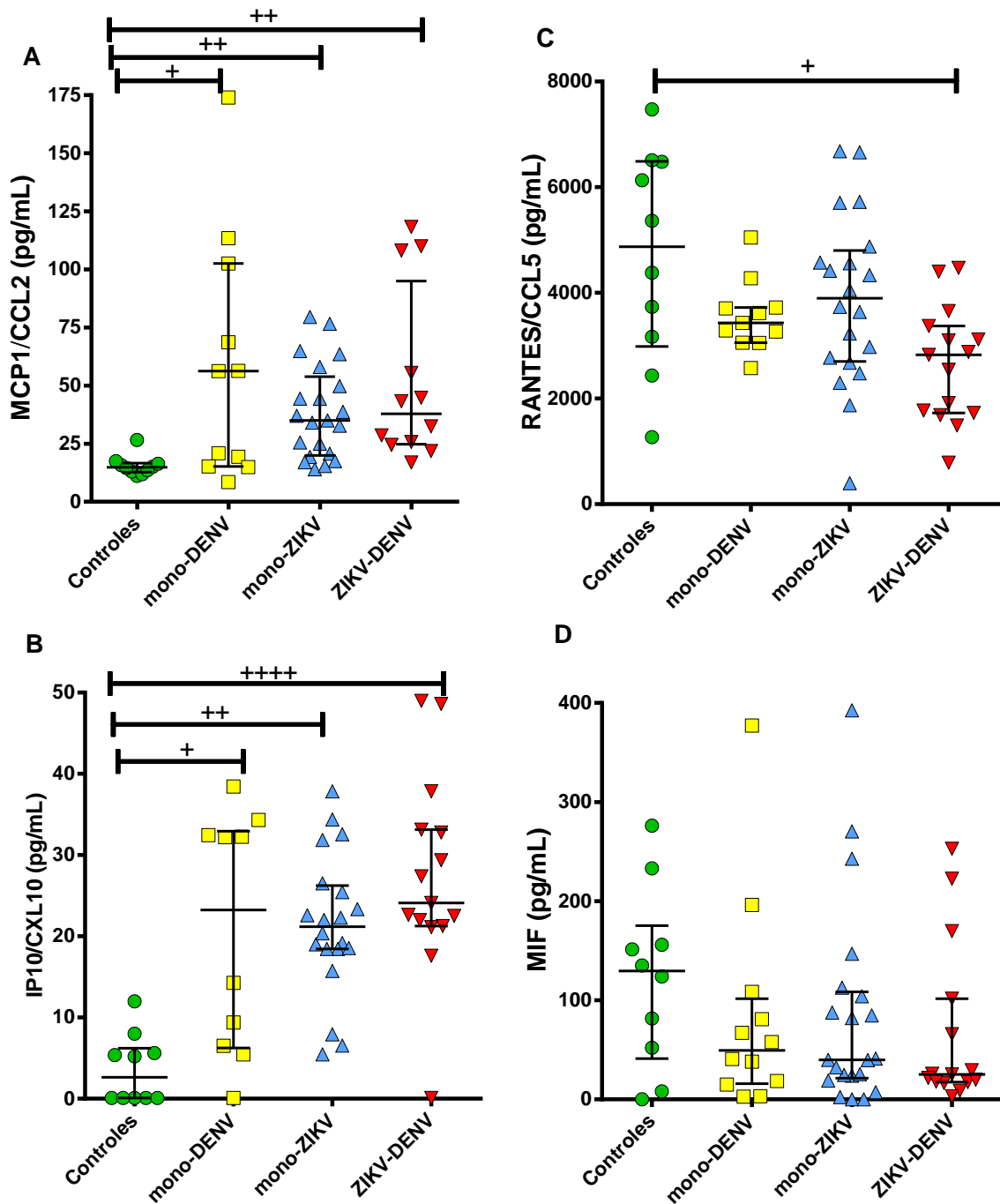


FIGURA 26: Quantificação de quimiocinas circulantes em pacientes mono infectados pelo DENV, mono infectados pelo ZIKV ou coinfectados com DENV/ZIKV. A quantificação das quimiocinas IP10 (A), MCP1/CCL2(B), RANTES/CCL5 (C) e MIF (D), em controles e nos diferentes grupos. Na análise estatística foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* com o pós-teste de comparação de *Dunn*. * $P < 0,01$ ** $P < 0,001$ *** $P < 0,0001$. Valores de $P < 0,05$ foram considerados significativos.

10.3 CORRELAÇÃO ENTRE OS NÍVEIS CIRCULANTES DAS CITOCINAS E QUIMIOCINAS COM OS PARÂMETROS LABORATORIAIS

A fim de identificar as possíveis associações entre os fatores solúveis estudados em cada tipo de infecção, avaliamos a correlação entre as citocinas/quimiocinas com os parâmetros laboratoriais. Os resultados demonstraram correlação inversa entre os níveis circulantes de TNF- α com a contagem dos leucócitos, linfócitos e monócitos, no grupo mono infectado pelo dengue. Da mesma forma, observamos correlação inversa entre os níveis circulantes da IP-10/CXL10 com a contagem dos leucócitos, linfócitos e monócitos no grupo co infectado (TABELA 7).

TABELA 7: Associações entre as citocinas, quimiocinas e parâmetros laboratoriais.

Correlações	Classificação dos grupos de acordo com o tipo de infecção	
	Pacientes mono infectados com DENV	Pacientes co infectados com DENV/ZIKV
Citocinas e quimiocinas x Parâmetros Laboratoriais		
TNF- α x leucócitos	r (-) 0,7205 p< 0,0001	NS
TNF- α x linfócitos	r(-) 0,6575 p=0,0002	NS
TNF- α x monócitos	r(-) 0,4657 p=0,0165	NS
IP10 x leucócitos	NS	r(-) 0,6167 p=0,0211
IP10 x linfócitos	NS	r(-) 0,5429 p=0,0479
IP10 x monócitos	NS	r(-) 0,7451 p=0,0031

Foi utilizada a correlação de *Spearman*. Valores de p foram considerados significativos quando: P < 0,05. NS refere-se à correlação não significativa

11. CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS, DEMOGRÁFICAS E IMUNOLÓGICAS DE GESTANTES

Onze gestantes foram analisadas no nosso estudo com idades entre 19-43 anos (mediana: 26 anos) e seis dias de infecção [mediana (IC95%): seis dias (2-21)]. Todas as gestantes apresentaram sinais de infecção por arboviroses durante a gravidez. De acordo com a TABELA 8, podemos observar que quatro gestantes foram monoinfectadas pelo DENV, de acordo com o teste de RT-PCR (4/11; 36%) e uma apresentou anticorpos anti-DENV classe IgM. Cinco gestantes apresentaram infecção pelo ZIKV, de acordo com a RT-PCR (5/11;45,4%) e destas, duas apresentaram coinfeção pelo DENV-1. Todas as gestantes apresentaram anticorpos anti-DENV classe IgG, indicando infecção prévia pelo DENV.

Não foram observadas diferenças em relação às manifestações clínicas entre gestantes infectadas pelo ZIKV quando comparadas àquelas infectadas pelo DENV. Em geral, as gestantes infectadas com ZIKV tiveram menos febre e prostração, e todas apresentaram exantema, mas devido ao pequeno tamanho amostral, não foi possível realizar análise estatística.

Em relação aos parâmetros laboratoriais, não foram observadas diferenças significativas nos percentuais do HT [mediana IC95% (DENV 34 (30-41) % vs. ZIKV 37,7(35-42) %, respectivamente], nas contagens das plaquetas [mediana IC95% DENV 244 (41-396) 10^3 /mm³ vs. ZIKV 231 (206-251) 10^3 /mm³, respectivamente] ou nas contagens dos leucócitos [mediana IC95% (DENV 11300 (3500-12200) /mm³ vs. ZIKV 5500 (3200-8200) /mm³ respectivamente]. Da mesma forma, não foram encontradas diferenças significativas nas contagens dos linfócitos [mediana IC95% (DENV 1749 (945-2499) /mm³ vs. ZIKV 1807 (1056-2080) /mm³ respectivamente] ou nas contagens dos monócitos [mediana IC95% (DENV 595 (280-976) /mm³ vs. ZIKV 379 (224-656) /mm³ respectivamente (TABELA 8)

Três fetos de mães infectadas pelo ZIKV (3/5) apresentaram exames de ultrassonografia normais e circunferências cefálicas normais. Os recém-nascidos encontram-se saudáveis até o momento segundo relatos das mães entrevistadas. Um bebê nasceu com plagiocéfalia posicional e esteve na unidade de terapia intensiva (UTI) por dois meses, mas após alta hospitalar, segundo relato dos pais, a criança encontra-se saudável. Apenas uma criança faleceu imediatamente após nascimento com insuficiência respiratória. Estes foram os únicos desfechos anormais observados e provenientes de gestantes coinfectadas pelo DENV-1/ZIKV. Todas as gestantes monoinfectadas pelo DENV tiveram desfechos favoráveis e os recém-nascidos encontram-se saudáveis até o momento.

TABELA 8: Características clínicas e demográficas de gestantes incluídas no estudo.

Caso	Idade Gestacional (semanas)	Sinais e Sintomas	ZIKV diag. molecular	DENV diag. molecular	anti-DENV IgM	anti-DENV IgG	captura antígeno NS1 DENV	Resultado recém-nascido
1	27	Cefaleia, Exantema, Prurido, Dor abdominal	+	-	-	+	-	Nascido vivo. Criança saudável desde o nascimento
2	20	Artralgia, Exantema, Prurido	+	-	+	+	+	Nascido vivo. Criança saudável desde o nascimento
3	12	Cefaleia, Prostração, Mialgia, Lombalgia, Anorexia, Náusea, Vômito	-	+	-	+	-	Nascido vivo. Criança saudável desde o nascimento
4	9	Febre, Cefaleia, Prostração, Dor abdominal, Exantema, Prurido, Dor retro-orbital	+	+	-	+	-	Nascido vivo. Plagiocefalia funcional
5	28	Cefaleia, Artralgia, Lombalgia, Exantema, Prurido	-	-	-	+	-	Não disponível
6	26	Febre, Prostração, Mialgia, Artralgia, Dor retro-orbital, Anorexia, Exantema, Prurido	-	+	+	+	+	Nascido vivo. Criança saudável desde o nascimento
7	36	Febre, Cefaleia, Prostração, Lombalgia, Dor retro-orbital, Náusea, Exantema, Prurido, Tontura	-	+	-	+	-	Nascido vivo. Criança saudável desde o nascimento
8	28	Febre, Cefaleia, Prostração, Mialgia, Dor retro-orbital	-	+	-	+	-	Não disponível
9	16	Cefaleia, Mialgia, Artralgia, Lombalgia, Exantema, Prurido, Dor retro-orbital, Anorexia	+	-	-	+	+	Não disponível
10	20	Febre, Exantema, Hiperemia Conjuntival, Dor retro-orbital	+	+	-	+	-	Falecido. Insuficiência respiratória
11	21	Cefaleia, Mialgia	-	-	+	+	+	Nascido vivo. Criança saudável desde o nascimento

11.1 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS EM GESTANTES

Com intuito de avaliar a resposta imune durante a infecção pelo DENV ou ZIKV, investigamos os níveis circulantes de citocinas pró-inflamatórias, quimiocinas, moléculas de adesão e fatores de crescimento nas gestantes incluídas no estudo. Como controle, foram utilizadas amostras de cinco gestantes saudáveis sem histórico de infecção previa nos três últimos meses. As citocinas (IL1RA, IL-6, IL-2, IL-5, IL-10, IL-12, IL-7, IL-13, IL-17 A, IL-4, IL-1 β , IL-9, IL-15, IFN- γ e TNF- α), quimiocinas (IL-8, MIP1 β , RANTES/CCL5, eotaxina, IP10/CXCL10, MCP1/CCL2, MIP1 α), moléculas de adesão e fatores de crescimento (G-CSF, *basic-FGF*, VEGF, PDGF-BB, GM-CSF) foram quantificados nas amostras séricas através do kit *Bio-Plex Panel 27 Plex* (Bio-Rad).

Para análise dos resultados obtidos, utilizamos o teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* com o pós-teste de comparação de *Dunn*. Os resultados demonstraram níveis significativamente menores das citocinas IL-4, IL-6 e da quimiocina MIP1 α nas gestantes infectadas pelo ZIKV quando comparadas às gestantes saudáveis. [IL-4 Saudáveis 139 (65-197) pg/mL vs. ZIKV 50 (24-72) pg/mL; IL-6 Saudáveis 301 (145-313) pg/mL vs. ZIKV 98 (40-118) pg/mL; MIP1 α Saudáveis 51 (27-122) pg/mL vs. ZIKV 15 (5,7-22) pg/mL]. Similarmente, níveis significativamente menores de IL-7 foram observados nas gestantes infectadas pelo DENV [Saudáveis 1755 (1038-2630) pg/mL vs. DENV 743 (0,01-1209) pg/mL]. Devido ao pequeno tamanho amostral (n=2), não foi possível analisar esses fatores na coinfeção DENV/ZIKV (Figura 27).

Utilizando a análise estatística através do teste não paramétrico de Mann-Whitney, observamos que tanto gestantes infectadas pelo ZIKV como aquelas infectadas pelo DENV apresentaram níveis significativamente menores das citocinas IL-4, IL-7 e MIP-1 α . Apesar de não encontramos diferença estatisticamente significativa, observamos uma tendência a médias mais altas nas dosagens do Fator de Crescimento dos Fibroblastos (*Basic-FGF*) nas gestantes infectadas pelo DENV. Além disso, observamos uma tendência a medias mais baixas nas dosagens de TNF- α nas gestantes infectadas pelo DENV (Tabela 9).

TABELA 9: Fatores solúveis quantificados em gestantes saudáveis e infectadas com DENV e/ou ZIKV

<i>Fator solúvel</i>	<i>Saudável n=5</i>	<i>DENV n=5</i>	<i>ZIKV n=5</i>	<i>P</i>
Basic FGF	0.01 (0.01-633)	542 (426-700)	455 (0.01-678)	DENV x saudáveis: 0,0714
CCL2/MCP1	0.01 (0.01-52)	0.01 (0.01-259)	0.01 (0.01-135)	NS
CXCL10/IP10	5858 (3545-17111)	3703 (0.01-6371)	0.01 (0.01-24465)	NS
G-CSF	427 (249-1290)	542 (0.01-555)	529 (376-555)	NS
IFN-γ	2207 (1058-3216)	1713 (1522-2169)	1752 (1058-1904)	NS
IL1RA	9576 (2399-145429)	7379 (0.01-26212)	7512 (0.01-50905)	NS
IL1-β	464 (210-2042)	305 (143-590)	333.3 (232-440)	NS
IL-4	139 (65-197)	55 (41-93)	50 (24-72)	DENV x saudáveis: 0,0317 ⁺ ZIKV x saudáveis: 0,0159 ⁺
IL-5	28 (8.1-63)	8.1 (1.7-25)	23 (0.05-63)	NS
IL-6	301 (145-313)	127 (78-385)	98 (40-118)	ZIKV x Saudáveis: 0,0079 ⁺⁺
IL-7	1755 (1038-2630)	743 (0.01-1209)	863 (743-1096)	DENV x saudáveis: 0,0159 ⁺ ZIKV x saudáveis: 0,0238 ⁺
IL-8	250 (0.01-1046)	161 (106-245)	168 (110-276)	NS
IL-9	926 (0.01-354)	0.3 (0.01-106)	6.4 (0.01-443)	NS
IL-10	0.01 (0.01-479)	0.01 (0.01-168.9)	0.01 (0.01-15)	NS
IL-13	678 (126-7425)	232 (126-527)	268 (161-1065)	NS
IL-15	1096 (0.01-1317)	0.01 (0.01-1102)	758.1 (0.01-1551)	NS
MIP1α	51 (27-122)	18 (12-37)	15 (5.7-22)	DENV x saudáveis: 0,0317 ⁺ ZIKV x saudáveis: 0,0079 ⁺⁺
MIP1β	299 (24-1117)	96 (37-289)	114 (6.2-231)	NS
PDGF-BB	0.01 (0.01-36455)	4459 (2147-28240)	5321 (2431-15103)	NS
TNF-α	1014 (335-6079)	297 (0.01-1014)	375 (0.01-770)	DENV x saudáveis: 0,0635
VEGF	740 (0.01-1117)	1418 (168-2902)	553 (277-1466)	NS

▲ Gestantes coinfetadas DENV/ZIKV

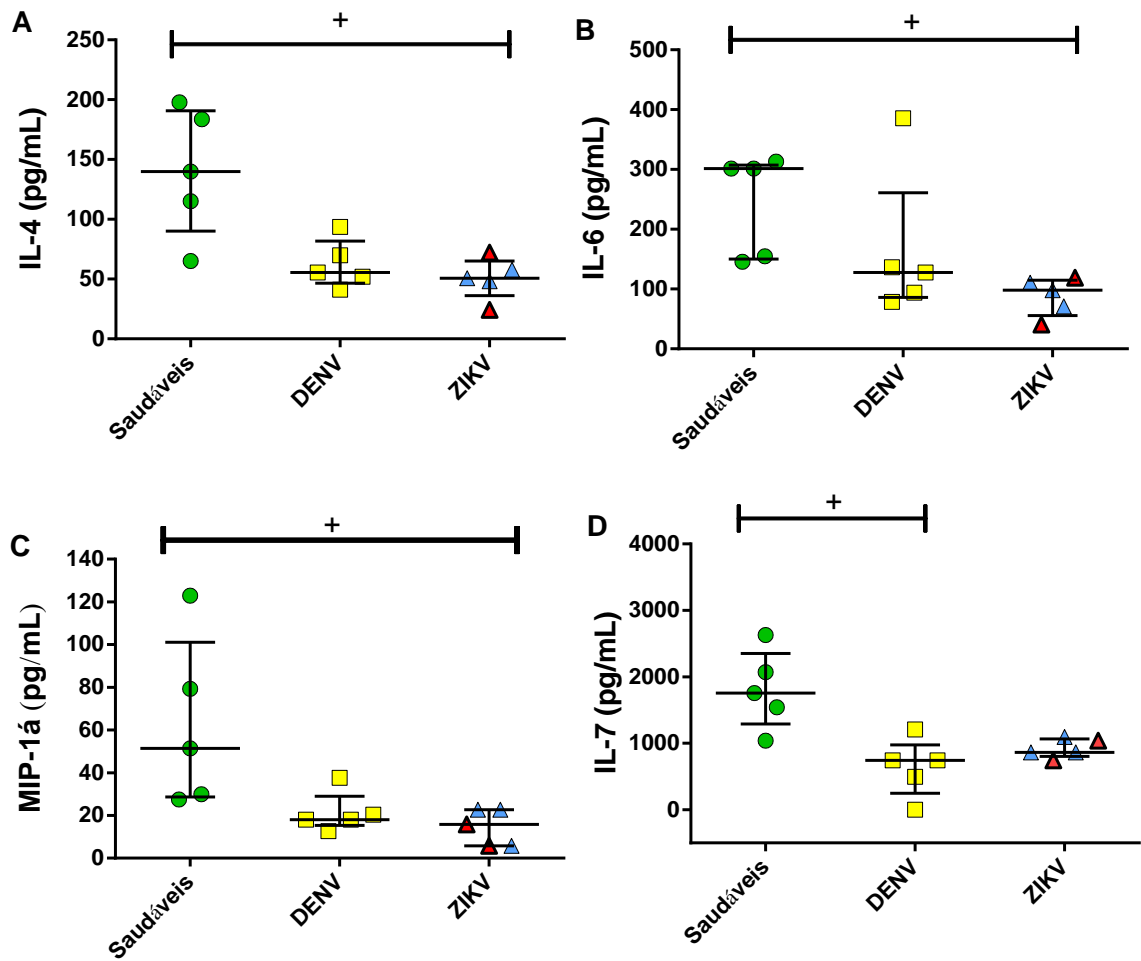


FIGURA 27: Quantificação de citocinas e quimiocinas circulantes em gestantes saudáveis e infectadas pelo DENV ou ZIKV. A quantificação das quimiocinas IP10 (A), MCP1/CCL2(B), RANTES/CCL5 (C) e MIF (D), em controles e nos diferentes grupos. Na análise estatística foi utilizado o teste *Kruskal-Wallis* com o pós-teste de comparação de *Dunn*. + P < 0,01 ++ P < 0,001 +++ P < 0,0001. Valores de P < 0,05 foram considerados significativos.

VI. DISCUSSÃO DOS RESULTADOS

O presente estudo descreveu parâmetros clínicos, epidemiológicos, laboratoriais e imunológicos de casos suspeitos de infecção por arbovírus em Campo Grande, MS, Brasil. Os pacientes suspeitos foram testados para DENV, ZIKV, CHIKV e MAYV através do diagnóstico molecular (RT-PCR). Sessenta e nove casos de infecção pelo dengue e trinta e oito de infecção zika foram confirmados usando protocolos moleculares. Nós relatamos a codetecção dos genomas do DENV e ZIKV em 13,4% dos pacientes estudados. O presente estudo descreveu os primeiros casos confirmados de infecção pelo Zika no município de Campo Grande, MS. Ainda, demonstrou a cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV, evidenciando a presença de coinfeção DENV/ZIKV na região centro oeste do Brasil.

Além do diagnóstico molecular, utilizamos também métodos sorológicos para a investigação de casos suspeitos de infecção pelo DENV ou pelo CHIKV. Desta forma, a presença de anticorpos da classe IgM anti-DENV ou anti-CHIKV foi analisada em todos os casos suspeitos. Métodos sorológicos são considerados como ferramenta útil no diagnóstico laboratorial da infecção pelo DENV. Entretanto, na presente investigação, apesar de muitas amostras procederem de quadros típicos de dengue, apenas trinta pacientes (30/134; 22,2%) apresentaram positividade para anticorpos anti-DENV da classe IgM. Amostras pareadas (agudas e convalescentes) são necessárias para confirmação do diagnóstico sorológico das infecções por dengue. Neste estudo, não analisamos amostras convalescentes, o que dificultou bastante a interpretação dos resultados. Outra importante questão é a reação cruzada com outros flavivírus e possível reatividade não específica que dificultou ainda mais a interpretação dos dados. Além disso, a baixa detecção de anticorpos da classe IgM provavelmente ocorreu devido ao tempo de infecção, visto que as amostras eram de fase aguda.

Apenas evidências sorológicas foram encontradas para CHIKV com identificação de anticorpos anti-CHIKV da classe IgM em sete pacientes (5,2%). Esses resultados corroboram com o quadro epidêmico em crescimento na região do MS conforme dados publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS / MS que registrou 57 casos CHIKV em Campo Grande até 52ª semana epidemiológica de 2015 (Brasil 2016a). A febre chikungunya tem aumentado gradativamente no MS, segundo dados dos boletins epidemiológicos da Secretaria do Estado de Saúde (SES). Em 2016 foram notificados 430 casos da doença e em 2017, 573 casos. Mais da metade dos casos infecção pelo CHIVK notificados em 2018 ocorreram em Dourados e Campo Grande segundo dados da SES (SES/MS 2016,2017 e 2018).

Em relação ao teste de NS1, pouco se sabe acerca da reatividade cruzada entre a proteína NS1 do dengue com outros flavivírus. Gyurech e colaboradores observaram um resultado falso-positivo para NS1 do dengue em um caso de infecção por ZIKV (Gyurech *et al.* 2016). Em nosso estudo, observamos que os pacientes positivos para o DENV

apresentaram uma frequência significativa de resultados positivos através do teste de NS1 em relação aos monoinfectados pelo ZIKV. De forma consoante, nenhum resultado falso-positivo de dengue NS1 foi encontrado em pacientes com Zika da Guiana Francesa (Matheus *et al.* 2016). Esses resultados sugerem que o teste NS1 é confiável e deve ser aplicável na vigilância da dengue mesmo durante os surtos de ZIKV. De forma interessante, recente trabalho do nosso grupo demonstrou que linfócitos T dos pacientes infectados pelo ZIKV não responderam ao estímulo com proteína NS1 do DENV *in vitro* e apenas as células T de pacientes infectados pelo DENV foram responsivas após estímulo com a proteína (Badolato-Corrêa *et al.* 2018).

A maioria das amostras testadas foi positiva para dengue através da RT-PCR. O DENV-1 foi o sorotipo predominante com maior número de casos positivos e menor frequência de casos de DENV-4 foi encontrada. Faria e colaboradores (2016) realizaram análise de epidemias ocorridas em Campo Grande (MS) em dois períodos distintos (DENV1/2 em 2010 e DENV-4 em 2013), demonstrando a cocirculação dos três sorotipos na região (Faria *et al.* 2016b). Ainda, o elevado número de casos de DENV em Campo Grande (MS) corrobora os dados publicados pela Secretaria de Vigilância em Saúde - SVS/MS (2016), que confirmou 4.313 casos da doença, na região Centro Oeste, em 2016.

Com relação à região e ao bairro de origem dos pacientes confirmados para as arboviroses estudadas, os resultados indicam uma prevalência de casos na Região do Segredo (63,4%) da cidade, com destaque para os bairros Conjunto Residencial Estrela do Sul e Monte Castelo, o que provavelmente se justifica pela proximidade dos bairros com a localização da UPA Coronel Antonino, que foi o local onde ocorreram as coletas de amostras biológicas deste estudo.

Devido à cocirculação de DENV, CHIKV e ZIKV no Brasil, o diagnóstico diferencial com a utilização de métodos moleculares é essencial na confirmação das infecções por arbovírus. Em nosso estudo, a detecção e tipagem de DENV em todas as amostras foram realizadas usando mais de um protocolo de RT-PCR (Lanciotti *et al.* 1992, Bronzoni *et al.* 2005, Johnson *et al.* 2005). Todas as amostras que foram negativas pela RT-PCR convencional (Lanciotti *et al.* 1992) foram testadas utilizando o protocolo de RT-PCR em tempo real descrito por Johnson *et al.* (2005) e o kit Simplex[™] DENV (*Focus Diagnostics, California, EUA*). Esta estratégia aumentou a detecção de DENV e foi possível identificar o genoma do DENV em 47% das amostras (18/38) positivas para ZIKV, evidenciando um número elevado de casos coinfectados por DENV e ZIKV. Na literatura, alguns casos de coinfeção já vêm sendo relatados. A cocirculação dos arbovírus proporcionou a ocorrência de coinfeção por DENV e CHIKV, como observado durante um surto em 2013 em Laos (Phommanivong *et al.* 2016) e em 1962-1964 na Tailândia (Halstead *et al.* 1969). Em 2006, coinfeções com DENV e CHIKV foram relatadas na Ásia (Nayar *et al.* 2007). Mais recentemente, infecções por ZIKV, DENV e CHIKV foram relatadas na Nicarágua e

coinfecções com um, dois ou mais vírus foram encontradas (Waggoner *et al.* 2016). Além disso, foram relatados casos de coinfeção por CHIKV e ZIKV no estado da Bahia (Campos *et al.* 2015) e por ZIKV e DENV em Pernambuco, Brasil (Brito *et al.* 2016).

É provável que casos de coinfeções não estejam sendo identificadas, uma vez que os testes moleculares para todos os arbovírus não são normalmente realizados nos laboratórios de referência no Brasil ou no Sistema Único de Saúde (SUS). A maioria dos casos suspeitos de ZIKV não é confirmada por testes moleculares, visto que estes testes normalmente são realizados apenas para grávidas e recém-nascidos.

Em relação às pacientes gestantes, atualmente, faltam evidências definitivas sobre a coexposição intrauterina ao ZIKV e outras infecções virais e se a coinfeção afeta o risco de adquirir infecção ou gravidade da doença. Um estudo brasileiro de Rabelo e colaboradores forneceu evidências de exposição intrauterina tanto ao ZIKV quanto às infecções pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV), causando a síndrome congênita do Zika em uma criança não infectada, exposta ao HIV (Rabelo *et al.* 2017).

Os sinais e sintomas e parâmetros laboratoriais foram comparados entre os pacientes com DENV, ZIKV ou coinfectados. Em geral, os sinais e sintomas causados por estes vírus foram similares e os pacientes apresentaram febre, exantema, mialgia, prostração, cefaleia e hiperemia conjuntival. Resultados similares foram encontrados em estudos com pacientes brasileiros infectados pelo ZIKV (Cerbino-Neto *et al.* 2016, Brasil *et al.* 2016a, Brito *et al.* 2016). Recentemente, estudo demonstrou que grande parte dos pacientes brasileiros infectados pelo ZIKV apresentou prurido (Brasil *et al.*, 2016a). Nossos resultados corroboram estudos prévios, visto que também observamos que pacientes monoinfectados pelo ZIKV apresentaram maior frequência de prurido em relação aos infectados pelo DENV. Demonstramos que pacientes monoinfectados pelo dengue apresentaram maior frequência de prostração e vômitos.

Também avaliamos os parâmetros laboratoriais na tentativa de contribuir para o diagnóstico diferencial dessas viroses. Sabe-se que as infecções de dengue estão relacionadas com a trombocitopenia, principalmente nos casos graves (Azeredo *et al.* 2015). Por outro lado, existem poucos relatos de trombocitopenia grave durante a infecção por ZIKV (Shuaib *et al.* 2016). Neste estudo, observamos que apenas os pacientes monoinfectados por DENV apresentaram baixa contagem de plaquetas. Conforme descrito previamente, em geral, os pacientes com ZIKV apresentaram diminuição moderada na contagem de leucócitos e linfócitos (Shuaib *et al.* 2016).

O DENV tem levado a inúmeras epidemias no Brasil e desta forma as manifestações clínicas e os parâmetros laboratoriais são bastante estudados e conhecidos. A infecção pelo DENV pode variar desde uma doença febril branda até quadros mais graves com hemorragias e extravasamento de plasma podendo ser fatal caso não seja tratada

precocemente. Além disso, as infecções pelo DENV também são caracterizadas pelo envolvimento hepático, incluindo hepatomegalia e elevações nos níveis das transaminases, tanto nos casos brandos como nos graves (Samanta & Sharma 2015). Parâmetros laboratoriais são descritos como indicadores potenciais de gravidade tais como contagens das plaquetas (Lee *et al.* 2012), níveis de creatinina, ureia (Schmitz *et al.* 2011), AST/TGO e ALT/TGP (Sam *et al.* 2013), e os níveis de albumina e proteínas totais (Schmitz *et al.* 2011). Distinguir a dengue de outras doenças causadas por arbovírus é crucial para a realização de diagnóstico precoce e monitoramento de marcadores de gravidade. De forma importante, observamos níveis elevados de ALT/TGP nos pacientes DENV⁺ estudados, sugerindo que enzimas hepáticas possam ser consideradas como indicadores de infecção pelo vírus. No entanto, ainda são necessários mais estudos para confirmação desse indicador laboratorial.

Nosso estudo também avaliou se infecções subsequentes ou coinfeções por esses vírus poderiam afetar o curso clínico da doença e levar a um desfecho desfavorável. Seguindo a classificação OMS (WHO 2009) para o diagnóstico de dengue grave, verificamos que o DG foi menos frequente em pacientes coinfectados e a maioria se recuperou após um curso clínico brando. Relatos de coinfeção DENV/ZIKV são limitados e alguns estudos não encontraram desfechos clínicos graves (Chahar *et al.* 2009, Waggoner *et al.* 2016) corroborando nossos achados. No entanto, sete casos fatais de coinfeção de DENV e CHIKV foram relatados na Colômbia (Mercado *et al.* 2016). Recentemente, Brito e colaboradores (2017) relataram casos de coinfeção pelo ZIKV e CHIKV que desenvolveram complicações neurológicas (Brito *et al.* 2017). Destaca-se que os sorotipos de dengue encontrados foram DENV-1 e DENV-4, e os sorotipos DENV-2 e DENV-3, associados a casos graves não foram detectados. Embora a maioria dos casos coinfectados tenham apresentado manifestações clínicas brandas, dois pacientes necessitaram de hidratação venosa, reforçando a importância do monitoramento adequado dos pacientes e reconhecimento de sinais de alarme a fim de evitar formas graves da doença. Levando em consideração que existem poucos estudos com pacientes coinfectados, não é possível assegurar que esses indivíduos não possuam risco de desenvolver as formas graves da doença. O impacto da coinfeção na gravidade da doença permanece desconhecido, necessitando ainda de futuras investigações.

Nos propusemos também a quantificar fatores solúveis circulantes como citocinas e quimiocinas nos casos confirmados de dengue e/ou Zika, a fim de compreender o perfil de ativação imune sistêmica durante a infecção aguda por ZIKV, por DENV, bem como em casos de coinfeção. Os níveis circulantes dos mediadores inflamatórios CXCL10/IP10, CCL2/MCP1 e TNF- α foram significativamente elevados nos grupos monoinfectados ou coinfectados. No entanto, observamos que a infecção aguda pelo ZIKV induz uma ativação imune sistêmica discreta em comparação com o estado fisiológico saudável e em comparação à infecção aguda por DENV, envolvendo citocinas e quimiocinas pró-

inflamatórias e imunorreguladoras. Nossos achados corroboram com o trabalho de Barros et al (2018), que também verificou uma ativação imune modesta na fase aguda da ZIKV. O trabalho em questão tratou de comparar as fases agudas e convalescentes da infecção por ZIKV (Barros *et al.* 2018).

Tanto os pacientes mono infectados pelo DENV quanto os pacientes mono infectados pelo ZIKV apresentam níveis elevados das citocinas pró-inflamatórias TNF- α e IL-6 quando comparados ao grupo controle. Em resposta a lesão tecidual os leucócitos mononucleares assim como os polimorfonucleares secretam citocinas na circulação tais como TNF- α , IL1 β e IL-6 que induzem a expressão das proteínas de fase aguda. Esses mediadores inflamatórios induzem sequência de eventos, por exemplo, a resposta de fase aguda cuja função é restaurar a homeostase do organismo. No entanto, a produção exagerada dessas proteínas contribui para o desenvolvimento da sepse bacteriana (Schulte *et al.* 2013) e também ao fenômeno da “tempestade” de citocinas. Várias citocinas, inclusive o TNF- α e a IL-6 são frequentemente associadas à gravidade da dengue (Srikiatkachorn & Green 2010). Estudos com pacientes brasileiros demonstraram a associação do TNF- α com casos mais graves em pacientes infectados pelo DENV-2 (Braga *et al.* 2001). No nosso estudo, não encontramos relação entre as citocinas IL-6 e TNF- α e gravidade, certamente devido ao pequeno número de amostras testadas, mas provavelmente também devido aos sorotipos DENV-1 e DENV-4 encontrados no nosso grupo. Pacientes infectados pelo ZIKV apresentaram níveis elevados TNF- α e IL-6 comparados aos indivíduos saudáveis, corroborando estudos prévios (Barros *et al.* 2018).

De forma interessante, nos casos de coinfeção por DENV/ZIKV, foram observados altos níveis de algumas citocinas e quimiocinas estudadas. Neste sentido, pacientes coinfectados apresentaram elevada produção de IP10/CXCL10 e TNF- α . O receptor CXCR3, ligante de IP10 /CXCL10, é expresso nas células TCD4, TCD8 e NK e direciona o recrutamento destas células para os sítios inflamados (Karin & Razon 2018). Elevados níveis circulantes de IP10/CXCL10 e IL-5 foram relacionados com a presença de exantema e cefaleia, respectivamente, em pacientes infectados por ZIKV (Barros *et al.* 2018). Recentemente, um estudo identificou a IP10 /CXCL10 como biomarcador potencial da apoptose de neurônios fetais e SGB durante a infecção aguda pelo ZIKV (Naveca *et al.* 2018).

Estudos prévios do nosso grupo demonstraram o envolvimento da IP10/CXCL10 e IL-10 com a indução do extravasamento vascular e disfunção hepática durante a infecção pelo DENV em crianças (Ferreira *et al.* 2015). Também demonstramos elevados níveis de IP10/CXCL10 em pacientes com dengue brando (Pinto *et al.* 2012b), corroborando os resultados encontrados no presente estudo. Assim, estudos prévios enfatizam a importância da dinâmica de diferentes marcadores em diferentes momentos da infecção e o balanço na

produção de citocinas estaria relacionado com a resolução da doença ou progressão para casos mais graves.

IP10/CXCL10 é uma citocina pleiotrópica com ação sob monócitos, células NK e células T e induz migração, sendo um importante mediador da resposta inflamatória (Neville *et al.* 1997). No nosso estudo, observamos associação inversa dos níveis de IP10/CXCL10 com as contagens de leucócitos, monócitos e linfócitos nos pacientes coinfectados por DENV e ZIKV. Os monócitos representam importante fonte de IP10/CXCL10, e provavelmente são células envolvidas nos estágios iniciais da infecção. De acordo com a literatura, os monócitos do sangue periférico, especialmente, subtipos clássicos e não clássicos, são alvos primários da infecção pelo DENV (Azeredo *et al.* 2010) e também pelo ZIKV (Foo *et al.* 2017, Michlmayr *et al.* 2017). É provável que, uma vez ativados, os monócitos infectados produzam citocinas e migrem para diferentes sítios, promovendo a replicação viral.

O TNF- α é uma citocina pleiotrópica que regula muitas funções fisiológicas e patológicas tais como sobrevivência celular, apoptose, migração e inflamação (Pegoretti *et al.* 2018). De forma interessante, observamos associação inversa entre os níveis de TNF- α com as contagens de leucócitos, linfócitos e monócitos nos pacientes mono infectados pelo DENV. As baixas contagens de leucócitos observadas durante a infecção podem envolver mecanismos de migração ou apoptose (Azeredo *et al.* 2001, Torrentes-Carvalho *et al.* 2009, Pinto *et al.* 2012a). Além disso, níveis elevados de TNF- α foram detectados no grupo coinfectado. Recentemente, demonstramos que as células CD4⁺ de pacientes coinfectados DENV/ZIKV produziram baixas quantidades de TNF- α quando comparadas com as células CD4 dos pacientes mono infectados pelo ZIKV ou DENV (Badolato-Corrêa *et al.* 2018). Provavelmente, a elevada produção de TNF- α observada no grupo coinfectado seja principalmente produzida pelos monócitos.

No nosso estudo, todos os pacientes apresentaram elevados níveis circulantes de MCP1/CCL2 corroborando nossos dados prévios (Pinto *et al.* 2012b). Além disso, pacientes infectados pelo ZIKV e apresentando sintomas brandos apresentaram elevadas concentrações de MCP1/CCL2 (Lum *et al.* 2018).

Todos os pacientes apresentaram baixos níveis circulantes de RANTES/CCL5 mas apenas o grupo coinfectado apresentou níveis significativamente baixos comparados aos controles. RANTES/CCL5 é importante no recrutamento dos leucócitos para os sítios inflamados (Aldinucci & Colombatti 2014). Estudos prévios do nosso grupo corroboram esses achados, uma vez que já encontramos baixos níveis circulantes de RANTES/CCL5 no sangue de pacientes com Dengue, enquanto que elevada expressão foi encontrada no tecido hepático de caso fatais (Pinto *et al.* 2012b).

Elevados níveis circulantes de IFN- γ foram detectados nos pacientes mono infectados pelo ZIKV ou DENV e baixos níveis foram encontrados nos pacientes coinfectados. IFN- γ é

produzido principalmente pelos linfócitos ativados tais como TCD4 Th1 e TCD8, células $\gamma\delta$ T e células NK (Castro *et al.* 2018). Demonstramos baixa frequência de células TCD4 produtoras de IFN- γ nos pacientes coinfetados comparados com os monoinfetados demonstrando que estas células possuem importante impacto na produção do IFN- γ durante a coinfeção DENV/ZIKV (Badolato-Corrêa *et al.* 2018)

Encontramos elevados níveis de IL-15 nos pacientes monoinfetados. A IL-15 é uma citocina que compartilha funções com a IL-2, tais como ativação e proliferação de células NK além de promover proliferação de células T ativadas e indução das células T citotóxicas (Jabri & Abadie 2015). Estudos prévios do nosso grupo demonstraram associação entre níveis de IL-15 e células NK citotóxicas em pacientes apresentando manifestações clínicas brandas (Azeredo *et al.* 2006).

A IL-10 é uma citocina pleiotrópica produzida por uma variedade de tipos celulares e é envolvida na patogênese da autoimunidade, câncer e doenças infecciosas (Raeber *et al.* 2018). Estudos prévios demonstram que níveis de IL-10 em crianças com dengue aumentaram durante a fase de defervescência e naquelas que evoluíram para quadro de SCD (Butthep *et al.* 2012). Estudo também demonstrou maior produção de IL-10 em pacientes com DSSA e menor nos pacientes com sinais de alarme (Rathakrishnan *et al.* 2012). Nosso grupo também já demonstrou o envolvimento da IL-10 durante a infecção pelo DENV e a associação desta citocina com a plaquetopenia (Azeredo *et al.* 2001). Níveis elevados de IL-10 também já foram reportados durante a infecção pelo ZIKV em pacientes (Kam *et al.* 2017, Lum *et al.* 2018). Os autores não encontram associação da IL-10 com a gravidade da infecção pelo ZIKV, e elevados níveis circulantes de IL-10 foram encontrados nos pacientes sem complicações neurológicas (Kam *et al.* 2017). Encontramos grande variabilidade na produção de IL-10, porém não encontramos diferença estatística significativa entre os grupos analisados.

O fator de inibição dos macrófagos (MIF) foi inicialmente identificado como a primeira citocina capaz de inibir a migração dos macrófagos. É expresso amplamente por diversos tipos celulares tais como macrófagos, hepatócitos e células endoteliais. O MIF está envolvido com muitos processos biológicos tais como quimiotaxia, amplificação da resposta inflamatória dentre outros (Asare *et al.* 2017). Estudos recentes demonstraram a associação desta citocina com aumento da permeabilidade vascular e a replicação viral durante a infecção pelo DENV sugerindo papel importante na patogênese da infecção (Chuang *et al.* 2015). Além disso, o MIF tem sido relacionado com complicações do sistema nervoso central e desordens neurológicas (Leyton-Jaimes *et al.* 2018). Não encontramos diferença estatística significativa entre os níveis circulantes de MIF nos diferentes grupos de pacientes analisados. No entanto, os resultados demonstraram uma ligeira tendência de diminuição nos níveis circulantes de MIF nos pacientes em relação aos controles, provavelmente devido

às características clínicas da nossa amostragem, constituída de paciente brandos e sem complicações neurológicas e/ ou graves.

As citocinas estão intimamente relacionadas entre si, sugerindo vias comuns e efeitos sinérgicos. Além disso, possuem diversos padrões funcionais, como células Th1 (IFN- γ), Th2 (IL-5), sugerindo que nessas infecções há a ativação desses subgrupos de linfócitos T auxiliares na infecção aguda. Outras possíveis fontes de quimiocinas e citocinas envolvidas na infecção precoce por esses vírus são monócitos, células dendríticas e células NK (Barros *et al.* 2018).

Em relação às gestantes, tanto as infectadas pelo DENV como as infectadas pelo ZIKV apresentaram manifestações clínicas similares e nenhuma diferença significativa foi encontrada devido ao pequeno tamanho amostral. Apenas gestantes coinfectadas pelo DENV-ZIKV com 9 e 20 semanas de gestação respectivamente apresentaram desfechos desfavoráveis incluindo plagiocefalia posicional e um óbito após nascimento devido a insuficiência respiratória. Embora, os riscos de complicações neurológicas tenham sido relatados no primeiro trimestre, desfechos anormais foram reportados em todos os trimestres (Roberts & Frosch 2016, Brasil *et al.* 2016b, Soares de Souza *et al.* 2016). Nossos resultados enfatizam a importância do diagnóstico diferencial para DENV, ZIKV e CHIKV mesmo nas gestantes com diagnóstico de infecção pelo ZIKV. O impacto da coinfeção DENV/ZIKV ainda é desconhecido e apenas um estudo relatou caso de coinfeção durante a gestação sem complicações ou anormalidades (Villamil-Gómez *et al.* 2016)

A produção diferencial de mediadores solúveis foi investigada nas gestantes através da dosagem de 27 fatores solúveis tais como citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento. Surpreendentemente, apenas três mediadores: IL-6, IL-4 e MIP1 α apresentaram diferença significativa ao comparamos os grupos entre si. Níveis significativamente menores de IL-4, IL-6 e MIP1 α foram observados nas gestantes infectadas pelo ZIKV quando comparadas às gestantes saudáveis. Por outro lado, níveis significativamente menores de IL-7 foram encontrados nas gestantes infectadas pelo DENV.

Kam e colaboradores demonstraram que a produção diferencial das citocinas IL-18, e IP-10/CXL10 podem ser biomarcadores úteis na predição de mau prognóstico em recém-nascidos de gestantes infectadas pelo ZIKV. Os autores observaram que os recém-nascidos que apresentaram deformidades do sistema nervoso central (SNC) apresentaram elevada produção de IL-18 e IP10/CXL10 em comparação com os bebês nascidos saudáveis (Kam *et al.* 2017). Estudo de Ornelas e colaboradores reportou elevada concentração de citocinas Th1 (IFN- γ e TNF- α), Th2 (IL-4, IL5 e IL-10) no líquido amniótico de nove gestantes infectadas pelo ZIKV cujos bebês apresentaram diagnóstico de microcefalia sugerindo que esses fatores poderiam interferir no desenvolvimento fetal (Ornelas *et al.* 2017).

Devido ao pequeno número de gestantes analisadas, não foi possível observar diferenças significativas entre os fatores solúveis analisados. De forma interessante, de modo geral, pudemos observar baixos níveis de citocinas IL-6, IL-4 e TNF- α nas gestantes avaliadas. Além disso, a maioria dos bebês nasceram saudáveis e apenas dois bebês apresentaram desfechos desfavoráveis. Interessante, recente estudo demonstrou a associação entre produção exacerbada de TNF- α com inflamação neural em células fetais do cérebro infectadas pelo ZIKV *in vitro* (Lum *et al.* 2017). Estudos prospectivos com diferentes coortes serão necessários para avaliar biomarcadores potenciais que poderão auxiliar no diagnóstico clínico.

Embora não tenhamos avaliado a carga viral nem realizado sequenciamento do genoma nas amostras coinfectadas, diferentes protocolos moleculares foram aplicados para a detecção do DENV. Não encontramos diferenças nos valores de CT entre os pacientes monoinfectados ou coinfectados, no entanto, alguns casos coinfectados, apresentaram baixos valores de CT. A avaliação da carga viral tanto de DENV como de ZIKV em diferentes fases da infecção assim como a avaliação da resposta imune deverão ser objetos de estudos futuros.

VII. CONCLUSÕES

- Em 2016 houve a cocirculação de DENV, ZIKV e CHIKV com predomínio de casos de DENV-1 e ZIKV, além de coinfeções pelo DENV/ZIKV em Campo Grande, MS, Brasil;
- Nossos resultados enfatizaram a importância do diagnóstico diferencial para DENV, ZIKV e CHIKV em gestantes suspeitas de infecção pelo zika em áreas endêmicas, mesmo naquelas com diagnóstico positivo de infecção pelo ZIKV, dada a relevância das coinfeções.
- A utilização de diferentes métodos moleculares foi imprescindível para o diagnóstico diferencial das arboviroses, principalmente nas investigações de casos de coinfeções;
- Pacientes infectados pelo ZIKV apresentam maior frequência de prurido e edema em concordância com estudos prévios. Por outro lado, a infecção pelo DENV esteve associada à presença de prostração e vômitos. Em áreas onde circulam múltiplos arbovírus, a presença de prurido e edema poderá auxiliar na definição de caso suspeito de zika.
- Pacientes monoinfectados pelo ZIKV e coinfectados com ZIKV e DENV-1 apresentaram manifestações clínicas brandas e não evoluíram para quadros clínicos mais graves. No entanto, alguns pacientes monoinfectados pelo DENV e dois coinfectados com DENV-1/ZIKV necessitaram de hidratação venosa, reforçando a importância da conduta clínica adequada e do reconhecimento precoce dos sinais de alarme. Esses sinais são importantes uma vez que surgem antes do início do aparecimento da dengue grave e deverão ser considerados em casos suspeitos de ZIKV devido à possibilidade de coinfeção pelo DENV;
- Embora os parâmetros laboratoriais não tenham apresentado um valor significativo na discriminação desses vírus, os níveis circulantes das transaminases hepáticas, especialmente os níveis de ALT/TGP foram significativamente elevados nos pacientes com DENV e poderão ser úteis no diagnóstico diferencial bem como conduta clínica de pacientes em áreas de cocirculação destes arbovírus;

- Fatores solúveis como citocinas e quimiocinas estão relacionados com a imunopatogênese da dengue. Nosso estudo confirmou o aumento das citocinas TNF- α , IFN- γ , IL-6, IL-15, IL-10 e das quimiocinas IP10/CXL10, RANTES/CCL5 e MCP1/CCL2 nos pacientes monoinfectados com dengue;
- Pacientes monoinfectados pelo ZIKV apresentaram níveis de produção de citocinas similares, mas ligeiramente menores que aqueles encontrados nos pacientes monoinfectados pelo DENV, sugerindo que esta produção diferencial de citocinas/quimiocinas possa estar relacionada com as características clínicas induzidas por estas viroses;
- De forma interessante, elevados níveis circulantes de TNF- α , IP10/CXL10 e MCP1/CCL2 e baixos de RANTES/CCL5 foram observados durante a coinfeção. Estes resultados podem ter importantes implicações na patogênese da doença, uma vez que estas citocinas estão relacionadas com casos graves e/ou brandos da dengue. No entanto, o aprofundamento no entendimento do papel desses mediadores durante a coinfeção ainda é necessário.
- Gestantes infectadas pelo ZIKV apresentaram baixos níveis de IL-6, IL-4 e MIP1 α /CCL3 comparadas às gestantes saudáveis. Apesar do pequeno tamanho amostral, esses resultados enfatizam a importância de estudos imunológicos adicionais da imunidade induzida pela infecção durante a gravidez. Tais estudos podem ser fundamentais para o desenvolvimento de intervenções terapêuticas futuras;
- Finalmente, a presença concomitante dos três vírus leva a um difícil diagnóstico diferencial para os médicos, uma vez que as infecções apresentam sinais e sintomas semelhantes, tornando complexo o diagnóstico clínico. A identificação de parâmetros clínicos e biomarcadores associados à patogênese desses vírus torna-se um importante aliado capaz de prever um risco aumentado de desenvolvimento de formas graves da doença; além disso, poderá ajudar no diagnóstico diferencial dessas doenças.

VIII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Adibi JJ, Marques ETA, Cartus A, Beigi RH 2016. Teratogenic effects of the Zika virus and the role of the placenta. *The Lancet* 387: 1587–1590.
- Aldinucci D, Colombatti A 2014. The Inflammatory Chemokine CCL5 and Cancer Progression. *Mediators of Inflammation*.
- Asare Y, Schmitt M, Bernhagen J 2017. The vascular biology of macrophage migration inhibitory factor (MIF). *Thromb Haemost* 109: 391–398.
- Atkinson B, Hearn P, Afrough B, Lumley S, Carter D, Aarons EJ, Simpson AJ, Brooks TJ, Hewson R 2016. Detection of Zika Virus in Semen. *Emerg Infect Dis* 22: 940.
- Ayres CFJ 2016. Identification of Zika virus vectors and implications for control. *The Lancet Infectious Diseases* 16: 278–279.
- Azeredo EL, De Oliveira-Pinto LM, Zagne SM, Cerqueira DIS, Nogueira RMR, Kubelka CF 2006. NK cells, displaying early activation, cytotoxicity and adhesion molecules, are associated with mild dengue disease. *Clinical and Experimental Immunology* 143: 345–356.
- Azeredo EL, Monteiro RQ, Pinto LM de-Oliveira 2015. Thrombocytopenia in Dengue: Interrelationship between Virus and the Imbalance between Coagulation and Fibrinolysis and Inflammatory Mediators. *Mediators of Inflammation* 2015: 313842.
- Azeredo EL, Neves-Souza PC, Alvarenga AR, Reis SRNI, Torrentes-Carvalho A, Zagne S-MO, Nogueira RMR, Oliveira-Pinto LM, Kubelka CF 2010. Differential regulation of toll-like receptor-2, toll-like receptor-4, CD16 and human leucocyte antigen-DR on peripheral blood monocytes during mild and severe dengue fever. *Immunology* 130: 202–216.
- Azeredo EL, Zagne SMO, Santiago MA, Gouvea AS, Santana AA, Neves-Souza PCF, Nogueira RMR, Miagostovich MP, Kubelka CF 2001. Characterisation of Lymphocyte Response and Cytokine Patterns in Patients with Dengue Fever. *Immunobiology* 204: 494–507.
- Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Alves de Souza TM, Santos Barbosa L, Conrado Guerra Nunes P, Rocha Queiroz Lima M da, Gandini M, Bispo de Filippis AM, Venâncio da Cunha R, Leal de Azeredo E, Pinto LM de-Oliveira- 2018. Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. *Immunity, Inflammation and Disease*.
- Balmaseda A, Hammond SN, Pérez MA, Cuadra R, Solano S, Rocha J, Idiaquez W, Harris E 2005. Short report: assessment of the World Health Organization scheme for classification of dengue severity in Nicaragua. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 73: 1059–1062.
- Bandyopadhyay S, Lum LCS, Kroeger A 2006. Classifying dengue: a review of the difficulties in using the WHO case classification for dengue haemorrhagic fever. *Trop. Med. Int. Health* 11: 1238–1255.
- Barbosa da Silva J, Siqueira JB, Coelho GE, Vilarinhos PTR, Pimenta FG 2002. Dengue in Brazil: current situation and prevention and control activities. *Epidemiol Bull* 23: 3–6.
- Bardina SV, Bunduc P, Tripathi S, Duehr J, Frere JJ, Brown JA, Nachbagauer R, Foster GA, Krysztof D, Tortorella D, Stramer SL, García-Sastre A, Krammer F, Lim JK 2017. Enhancement of Zika virus pathogenesis by preexisting antinflavivirus immunity. *Science (New York, N.Y.)* 356: 175–180.
- Barreto ML, Teixeira MG 2008. Dengue in Brazil: epidemiological situation and contribution to a research agenda. *Estudos Avançados* 22: 53–72.

- Barros JB de S, Silva PAN da, Koga R de CR, Gonzalez-Dias P, Carmo Filho JR, Nagib PRA, Coelho V, Nakaya HI, Fonseca SG, Pfrimer IAH 2018. Acute Zika Virus Infection in an Endemic Area Shows Modest Proinflammatory Systemic Immunoactivation and Cytokine-Symptom Associations. *Frontiers in Immunology* 9: 821.
- Basu Atanu, Chaturvedi Umesh C. 2008. Vascular endothelium: the battlefield of dengue viruses. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 53: 287–299.
- Bearcroft W 1956. Zika virus infection experimentally induced in a human volunteer. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 50: 442–448.
- Besnard M, Lastère S, Teissier A, Cao-Lormeau VM, Musso D 2014. Evidence of perinatal transmission of Zika virus, French Polynesia, December 2013 and February 2014. *Eurosurveillance* 19.
- Bhatt S, Gething PW, Brady OJ, Messina JP, Farlow AW, Moyes CL, Drake JM, Brownstein JS, Hoen AG, Sankoh O, Myers MF, George DB, Jaenisch T, Wint GRW, Simmons CP, Scott TW, Farrar JJ, Hay SI 2013. The global distribution and burden of dengue. *Nature* 496: 504–507.
- Bozza FA, Cruz OG, Zagne SM, Azeredo EL, Nogueira RM, Assis EF, Bozza PT, Kubelka CF 2008. Multiplex cytokine profile from dengue patients: MIP-1beta and IFN-gamma as predictive factors for severity. *BMC Infectious Diseases* 8: 86.
- Braga EL, Moura P, Pinto LM, Ignácio SR, Oliveira MJC, Cordeiro MT, Kubelka CF 2001. Detection of circulat tumor necrosis factor-a , soluble tumor necrosis factor p75 and interferon-g in Brazilian patients with dengue fever and dengue hemorrhagic fever. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 96: 229–232.
- Braga IA, Valle D 2007. *Aedes aegypti*: History of Control in Brazil. *Epidemiologia e Serviços de Saúde* 16: 113–118.
- Brasil 2009. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS). Informe Epidemiológico da Dengue Semanas de 1 a 52 de 2009. : 1–28.
- Brasil 2015a. Secretaria de Vigilância em Saúde/ Ministério da Saúde. (SVS/MS). Boletim Epidemiológico. Febre pelo vírus Zika: uma revisão narrativa sobre a doença. Vol 46 número 26: 1–7.
- Brasil 2015b. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Vigilância das Doenças Transmissíveis. Protocolo de vigilância e resposta à ocorrência de microcefalia relacionada à infecção pelo vírus Zika.
- Brasil 2016a. Secretaria de Vigilância em Saúde. Ministério da Saúde. (SVS/MS). Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2015. Vol 47 número 3: 1–10.
- Brasil MS 2016b. Dengue: diagnóstico e manejo clínico – Criança.
- Brasil MS 2016c. Dengue: diagnóstico e manejo clínico – Adulto e Criança.
- Brasil 2017. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS). Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2016. Vol 48 número 3: 1–11.

- Brasil 2018a. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS). Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52, 2017. Vol 49 número 2: 1–13.
- Brasil 2018b. Secretaria de Vigilância em Saúde/Ministério da Saúde (SVS/MS). Boletim Epidemiológico. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 11 de 2018. Vol 49 abril 2018: 1–14.
- Brasil P, Calvet GA, Siqueira AM, Wakimoto M, Sequeira PC de, Nobre A, Quintana M de SB, Mendonça MCL de, Lupi O, Souza RV de, Romero C, Zogbi H, Bressan C da S, Alves SS, Lourenço-de-Oliveira R, Nogueira RMR, Carvalho MS, Filippis AMB de, Jaenisch T 2016a. Zika Virus Outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: Clinical Characterization, Epidemiological and Virological Aspects. *PLoS Negl Trop Dis* 10.
- Brasil P, Pereira JPJ, Moreira ME, Ribeiro Nogueira RM, Damasceno L, Wakimoto M, Rabello RS, Valderramos SG, Halai U-A, Salles TS, Zin AA, Horovitz D, Daltro P, Boechat M, Raja Gabaglia C, Carvalho de Sequeira P, Pilotto JH, Medialdea-Carrera R, Cotrim da Cunha D, Abreu de Carvalho LM, Pone M, Machado Siqueira A, Calvet GA, Rodrigues Baião AE, Neves ES, Nassar de Carvalho PR, Hasue RH, Marschik PB, Einspieler C, Janzen C, Cherry JD, Bispo de Filippis AM, Nielsen-Saines K 2016b. Zika Virus Infection in Pregnant Women in Rio de Janeiro. *New England Journal of Medicine* 375: 2321–2334.
- Brito CAA, Azevedo F, Cordeiro MT, Marques ETA, Franca RFO 2017. Central and peripheral nervous system involvement caused by Zika and chikungunya coinfection (GD Ebel, Ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 11: e0005583.
- Brito CAA de, Brito CCM de, Oliveira AC, Rocha M, Atanásio C, Asfora C, Matos JD, Lima AS, Albuquerque MFM, Brito CAA de, Brito CCM de, Oliveira AC, Rocha M, Atanásio C, Asfora C, Matos JD, Lima AS, Albuquerque MFM 2016. Zika in Pernambuco: rewriting the first outbreak. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 49: 553–558.
- Bronzoni RV de M, Baleotti FG, Ribeiro Nogueira RM, Nunes M, Moraes Figueiredo LT 2005. Duplex Reverse Transcription-PCR Followed by Nested PCR Assays for Detection and Identification of Brazilian Alphaviruses and Flaviviruses. *Journal of Clinical Microbiology* 43: 696–702.
- Butthep P, Chanhakan S, Yoksan S, Tangnararatchakit K, Chuansumrit A 2012. Alteration of Cytokines and Chemokines During Febrile Episodes Associated With Endothelial Cell Damage and Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 31.
- Calvet GA, Santos FBD, Sequeira PC 2016. Zika virus infection: epidemiology, clinical manifestations and diagnosis. *Curr. Opin. Infect. Dis.* 29: 459–466.
- Campagna D de S, Miagostovich MP, Siqueira MM, Cunha RV da 2006. Etiology of exanthema in children in a dengue endemic area. *Jornal de Pediatria* 82: 354–358.
- Campos GS, Bandeira AC, Sardi SI 2015. Zika Virus Outbreak, Bahia, Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 21: 1885–1886.
- Cao-Lormeau V-M, Roche C, Teissier A, Robin E, Berry A-L, Mallet H-P, Sall AA, Musso D 2014. Zika Virus, French Polynesia, South Pacific, 2013. *Emerg Infect Dis* 20: 1085–1086.
- Cardier JE, Mariño E, Romano E, Taylor P, Liprandi F, Bosch N, Rothman AL 2005. Proinflammatory factors present in sera from patients with acute dengue infection induce activation and apoptosis of human microvascular endothelial cells: Possible role of TNF- α in endothelial cell damage in dengue. *Cytokine* 30: 359–365.

- Carod-Artal FJ 2018. Neurological complications of Zika virus infection. *Expert Review of Anti-infective Therapy* 16: 399–410.
- Castro F, Cardoso AP, Gonçalves RM, Serre K, Oliveira MJ 2018. Interferon-Gamma at the Crossroads of Tumor Immune Surveillance or Evasion. *Frontiers in Immunology* 9: 847.
- Cavalcanti MG, Cabral-Castro MJ, Gonçalves JLS, Santana LS, Pimenta ES, Peralta JM 2017. Zika virus shedding in human milk during lactation: an unlikely source of infection? *International Journal of Infectious Diseases* 57: 70–72.
- CDC 2014. Interim Guidance for Managing Occupational Exposures to Zika Virus for Healthcare Personnel.
- CDC 2016. Revised diagnostic testing for Zika, chikungunya, and dengue viruses in US Public Health Laboratories.
- Cerbino-Neto J, Mesquita EC, Souza TML, Parreira V, Wittlin BB, Durovni B, Lemos MCF, Vizzoni A, Filippis AMB de, Sampaio SA, Gonçalves B de S, Bozza FA 2016. Clinical Manifestations of Zika Virus Infection, Rio de Janeiro, Brazil, 2015 - Volume 22, Number 7—July 2016 - Emerging Infectious Disease journal - CDC.
- Chahar HS, Bharaj P, Dar L, Guleria R, Kabra SK, Broor S 2009. Co-infections with Chikungunya Virus and Dengue Virus in Delhi, India. *Emerging Infectious Diseases* 15: 1077–1080.
- Chan M, Johansson MA 2012. The Incubation Periods of Dengue Viruses (N Vasilakis, Ed.). *PLoS ONE* 7: e50972.
- Chang C, Ortiz K, Ansari A, Gershwin ME 2016. The Zika outbreak of the 21st century. *Journal of Autoimmunity* 68: 1–13.
- Chen L-C, Lei H-Y, Liu C-C, Shiesh S-C, Chen S-H, Liu H-S, Lin Y-S, Wang S-T, Shyu H-W, Yeh T-M 2006a. Correlation of serum levels of macrophage migration inhibitory factor with disease severity and clinical outcome in dengue patients. *The American journal of tropical medicine and hygiene* 74: 142–147.
- Chen J-P, Lu H-L, Lai S-L, Campanella GS, Sung J-M, Lu M-Y, Wu-Hsieh BA, Lin Y-L, Lane TE, Luster AD, Liao F 2006b. Dengue Virus Induces Expression of CXC Chemokine Ligand 10/IFN- γ -Inducible Protein 10, Which Competitively Inhibits Viral Binding to Cell Surface Heparan Sulfate. *J. Immunol.* 177: 3185.
- Chen R, Vasilakis N 2011. Dengue — Quo tu et quo vadis? *Viruses* 3: 1562–1608.
- Chuang Y-C, Chen H-R, Yeh T-M 2015. Pathogenic roles of macrophage migration inhibitory factor during dengue virus infection. *Mediators of inflammation* 2015.
- Clyde K, Kyle JL, Harris E 2006. Recent advances in deciphering viral and host determinants of dengue virus replication and pathogenesis. *J. Virol.* 80: 11418–11431.
- Coimbra TLM, Santos CLS, Suzuki A, Petrella SMC, Bisordi I, Nagamori AH, Marti AT, Santos RN, Fialho DM, Lavigne S, Buzzar MR, Rocco IM 2007. Mayaro virus: imported cases of human infection in São Paulo State, Brazil. *Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo* 49: 221–224.
- Colbert JA, Gordon A, Roxelin R, Silva S, Silva J, Rocha C, Harris E 2007. Ultrasound Measurement Of Gallbladder Wall Thickening As A Diagnostic Test And Prognostic Indicator For Severe Dengue In Pediatric Patients. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 26: 850–852.

- Cordeiro MT, Pena LJ, Brito CA, Gil LH, Marques ET 2016. Positive IgM for Zika virus in the cerebrospinal fluid of 30 neonates with microcephaly in Brazil. *The Lancet* 387: 1811–1812.
- Corry J, Arora N, Good CA, Sadovsky Y, Coyne CB 2017. Organotypic models of type III interferon-mediated protection from Zika virus infections at the maternal–fetal interface. *Proc Natl Acad Sci USA*.
- Costa VV, Fagundes CT, Souza DG, Teixeira MM 2013. Inflammatory and Innate Immune Responses in Dengue Infection. *The American Journal of Pathology* 182: 1950–1961.
- Costa VV, Fagundes CT, Valadão DF, Cisalpino D, Dias ACF, Silveira KD, Kangussu LM, Ávila TV, Bonfim MRQ, Bonaventura D, Silva TA, Sousa LP, Rachid MA, Vieira LQ, Menezes GB, Paula AM de, Atrasheuskaya A, Ignatyev G, Teixeira MM, Souza DG 2012. A Model of DENV-3 Infection That Recapitulates Severe Disease and Highlights the Importance of IFN- γ in Host Resistance to Infection. *PLoS Negl Trop Dis* 6.
- Cruz-Oliveira C, Freire JM, Conceição TM, Higa LM, Castanho MARB, Da Poian AT 2015. Receptors and routes of dengue virus entry into the host cells. *FEMS Microbiology Reviews* 39: 155–170.
- Cunha RV da, Trinta KS 2017. Chikungunya virus: clinical aspects and treatment - A Review. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 112: 523–531.
- Cunha RV da, Geniole LAI, Brito CAA de, França NP dos S, Santos Neto OG dos, Nascimento DDG do, Grillo Z del CF, Guerrero ATG, Oliveira SM do VL de, Muller K de TC 2016. Zika: abordagem clínica na atenção básica.
- Dai Lianpan, Wang Qihui, Qi Jianxun, Shi Yi, Yan Jinghua, Gao George F. 2016. Molecular basis of antibody-mediated neutralization and protection against flavivirus. *IUBMB Life* 68: 783–791.
- Dang J, Tiwari SK, Lichinchi G, Qin Y, Patil VS, Eroshkin AM, Rana TM 2016. Zika Virus Depletes Neural Progenitors in Human Cerebral Organoids through Activation of the Innate Immune Receptor TLR3. *Cell stem cell* 19: 258–265.
- Deen GF, Broutet N, Xu W, Knust B, Sesay FR, McDonald SLR, Ervin E, Marrinan JE, Gaillard P, Habib N, Liu H, Liu W, Thorson AE, Yamba F, Massaquoi TA, James F, Ariyarahaj A, Ross C, Bernstein K, Coursier A, Klena J, Carino M, Wurie AH, Zhang Y, Dumbuya MS, Abad N, Idriss B, Wi T, Bennett SD, Davies T, Ebrahim FK, Meites E, Naidoo D, Smith SJ, Ongpin P, Malik T, Banerjee A, Erickson BR, Liu Y, Liu Y, Xu K, Brault A, Durski KN, Winter J, Sealy T, Nichol ST, Lamunu M, Bangura J, Landoulsi S, Jambai A, Morgan O, Wu G, Liang M, Su Q, Lan Y, Hao Y, Formenty P, Ströher U, Sahr F 2015. Ebola RNA Persistence in Semen of Ebola Virus Disease Survivors — Final Report. *N Engl J Med* 377: 1428–1437.
- Deen JL, Harris E, Wills B, Balmaseda A, Hammond SN, Rocha C, Dung NM, Hung NT, Hien TT, Farrar JJ 2006. The WHO dengue classification and case definitions: time for a reassessment. *Lancet* 368: 170–173.
- Dégallier N, Rosa AP da, Vasconcelos PF, Figueiredo LT, Rosa JF da, Rodrigues SG, Rosa ES da 1996. [Dengue and its vectors in Brazil]. *Bull Soc Pathol Exot* 89: 128–135; discussion 136.
- Dejnirattisai W, Supasa P, Wongwiwat W, Rouvinski A, Barba-Spaeth G, Duangchinda T, Sakuntabhai A, Cao-Lormeau V-M, Malasit P, Rey FA, Mongkolsapaya J, Screaton GR 2016. Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with Zika virus. *Nat Immunol* 17: 1102–1108.

- Dick GW. 1952. Zika virus (II). Pathogenicity and physical properties. *Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 46: 521–534.
- Dick GWA, Kitchen SF, Hadow AJ 1952. Zika virus (I). Isolations and serological specificity. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 46: 509–520.
- Doughty CT, Yawetz S, Lyons J 2017. Emerging Causes of Arbovirus Encephalitis in North America: Powassan, Chikungunya, and Zika Viruses. *Current Neurology and Neuroscience Reports* 17: 12.
- Duffy MR, Chen T-H, Hancock WT, Powers AM, Kool JL, Lanciotti RS, Pretrick M, Marfel M, Holzbauer S, Dubray C, Guillaumot L, Griggs A, Bel M, Lambert AJ, Laven J, Kosoy O, Panella A, Biggerstaff BJ, Fischer M, Hayes EB 2009. Zika Virus Outbreak on Yap Island, Federated States of Micronesia. *New England Journal of Medicine* 360: 2536–2543.
- Elong Ngonu A, Shresta S 2018. Immune Response to Dengue and Zika. *Annu. Rev. Immunol.* 36: 279–308.
- Epelboin Y, Talaga S, Epelboin L, Dusfour I 2017. Zika virus: An updated review of competent or naturally infected mosquitoes. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 11: e0005933.
- Fagbami AH 1979. Zika virus infections in Nigeria: virological and seroepidemiological investigations in Oyo State. *The Journal of Hygiene* 83: 213–219.
- Faria NRDC 2016. ESTUDO DE VARIÁVEIS VIRAIS, CLÍNICAS E IMUNOLÓGICAS ASSOCIADAS AO DENGUE VÍRUS TIPO 2 CIRCULANTE NO BRASIL.
- Faria NR, Azevedo R do S da S, Kraemer MU, Souza R, Cunha MS, Hill SC, Thézé J, Bonsall MB, Bowden TA, Rissanen I, Rocco IM, Nogueira JS, Maeda AY, Vasami FG da S, Macedo FL de L, Suzuki A, Rodrigues SG, Cruz ACR, Nunes BT, Medeiros DB de A, Rodrigues DSG, Queiroz ALN, Silva EVP da, Henriques DF, Rosa EST da, Oliveira CS de, Martins LC, Vasconcelos HB, Casseb LMN, Simith D de B, Messina JP, Abade L, Lourenço J, Alcantara LCJ, Lima MM de, Giovanetti M, Hay SI, Oliveira RS de, Lemos P da S, Oliveira LF de, Lima CPS de, Silva SP da, Vasconcelos JM de, Franco L, Cardoso JF, Vianez-Júnior JL da SG, Mir D, Bello G, Delatorre E, Khan K, Creatore M, Coelho GE, Oliveira WK de, Tesh R, Pybus OG, Nunes MRT, Vasconcelos PFC 2016a. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. *Science (New York, N.Y.)* 352: 345–349.
- Faria NR da C, Nogueira RMR, Filippis AMB de, Simões JBS, Nogueira F de B, Rocha Queiroz Lima M da, Santos FB dos 2013. Twenty Years of DENV-2 Activity in Brazil: Molecular Characterization and Phylogeny of Strains Isolated from 1990 to 2010 (AM Powers, Ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 7: e2095.
- Faria NR da C, Solorzano VEF, Nogueira RMR, Chouin-Carneiro T, Nunes PCG, Simões JBS, Bruycker Nogueira F de, Lima M da RQ, Oliveira Pinto LM de, Kubelka CF, Cunha RV da, Leal de Azeredo E, Santos FB dos 2016b. Dengue epidemics in two distinct periods reveal distinct epidemiological, laboratorial and clinical aspects in a same scenario: analysis of the 2010 and 2013 epidemics in Mato Grosso do Sul, Brazil. *Transactions of The Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene* 110: 228–236.
- Ferreira RAX, Oliveira SA de, Gandini M, Ferreira L da C, Correa G, Abiraude FM, Reid MM, Cruz OG, Kubelka CF 2015. Circulating cytokines and chemokines associated with plasma leakage and hepatic dysfunction in Brazilian children with dengue fever. *Acta Tropica* 149: 138–147.
- Figueiredo LT 2000. The Brazilian flaviviruses. *Microbes Infect.* 2: 1643–1649.

- Figueiredo LTM, Cavalcante SMB, Simoes MC 1991. Encuesta serológica sobre el dengue entre escolares de Rio de Janeiro, Brasil, 1986 y 1987. *Serological survey of dengue among schoolchildren in Rio de Janeiro, Brazil, 1986 and 1987*.
- Foo S-S, Chen W, Chan Y, Bowman JW, Chang L-C, Choi Y, Yoo JS, Ge J, Cheng G, Bonnin A, Nielsen-Saines K, Brasil P, Jung JU 2017. Asian Zika virus strains target CD14(+) blood monocytes and induce M2-skewed immunosuppression during pregnancy. *Nature microbiology* 2: 1558–1570.
- Foy BD, Kobylinski KC, Foy JLC, Blitvich BJ, Travassos da Rosa A, Haddow AD, Lanciotti RS, Tesh RB 2011. Probable Non-Vector-borne Transmission of Zika Virus, Colorado, USA. *Emerg Infect Dis* 17: 880–882.
- Franz AWE, Kantor AM, Passarelli AL, Clem RJ 2015. Tissue Barriers to Arbovirus Infection in Mosquitoes. *Viruses* 7: 3741–3767.
- Fried JR, Gibbons RV, Kalayanarooj S, Thomas SJ, Srikiatkachorn A, Yoon IK, Jarman RG, Green S, Rothman AL, Cummings DA 2010. Serotype-specific differences in the risk of dengue hemorrhagic fever: an analysis of data collected in Bangkok, Thailand from 1994 to 2006. *PLoS Negl Trop Dis* 4: e617.
- Fros JJ 2015. Emerging mosquito-borne viruses: transmission and modulation of host defence.
- Fuller TL, Calvet G, Genaro Estevam C, Rafael Angelo J, Abiodun GJ, Halai U-A, De Santis B, Carvalho Sequeira P, Machado Araujo E, Alves Sampaio S, Lima de Mendonça MC, Fabri A, Ribeiro RM, Harrigan R, Smith TB, Raja Gabaglia C, Brasil P, Bispo de Filippis AM, Nielsen-Saines K 2017. Behavioral, climatic, and environmental risk factors for Zika and Chikungunya virus infections in Rio de Janeiro, Brazil, 2015-16 (KK Ariën, Ed.). *PLoS ONE* 12: e0188002.
- Garcez PP, Loiola EC, Costa RM da, Higa LM, Trindade P, Delvecchio R, Nascimento JM, Brindeiro R, Tanuri A, Rehen SK 2016. Zika virus impairs growth in human neurospheres and brain organoids. *Science*: aaf6116.
- Gaskell KM, Houlihan C, Nastouli E, Checkley AM 2017. Persistent Zika Virus Detection in Semen in a Traveler Returning to the United Kingdom from Brazil, 2016. *Emerging Infectious Diseases* 23: 137–139.
- Gavegnano C, Bassit LC, Cox BD, Hsiao H-M, Johnson EL, Suthar M, Chakraborty R, Schinazi RF 2017. Jak Inhibitors Modulate Production of Replication-Competent Zika Virus in Human Hofbauer, Trophoblasts, and Neuroblastoma cells. *Pathogens & immunity* 2: 199–218.
- Gourinat A-C, O'Connor O, Calvez E, Goarant C, Dupont-Rouzeyrol M 2015. Detection of Zika Virus in Urine. *Emerging Infectious Diseases* 21: 84–86.
- Grard G, Caron M, Mombo IM, Nkoghe D, Mboui Ondo S, Jiolle D, Fontenille D, Paupy C, Leroy EM 2014. Zika Virus in Gabon (Central Africa) – 2007: A New Threat from *Aedes albopictus*? *PLOS Neglected Tropical Diseases* 8: e2681.
- Gregory CJ, Oduyebo T, Brault AC, Brooks JT, Chung K-W, Hills S, Kuehnert MJ, Mead P, Meaney-Delman D, Rabe I, Staples E, Petersen LR 2017. Modes of Transmission of Zika Virus. *The Journal of Infectious Diseases* 216: S875–S883.
- Gubler DJ 1998. Dengue and dengue hemorrhagic fever. *Clin. Microbiol. Rev.* 11: 480–496.

- Gubler DJ, Clark GG 1995. Dengue/dengue hemorrhagic fever: the emergence of a global health problem. *Emerg Infect Dis* 1: 55–57.
- Guzman MG, Gubler DJ, Izquierdo A, Martinez E, Halstead SB 2016. Dengue infection. *Nature Reviews Disease Primers* 2: 16055.
- Guzman MG, Jaenisch T, Gaczkowski R, Ty Hang VT, Sekaran SD, Kroeger A, Vazquez S, Ruiz D, Martinez E, Mercado JC, Balmaseda A, Harris E, Dimano E, Leano PSA, Yoksan S, Villegas E, Benduzu H, Villalobos I, Farrar J, Simmons CP 2010. Multi-Country Evaluation of the Sensitivity and Specificity of Two Commercially-Available NS1 ELISA Assays for Dengue Diagnosis (AM Powers, Ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4: e811.
- Guzman MG, Kouri G 2003. Dengue and dengue hemorrhagic fever in the Americas: lessons and challenges. *J. Clin. Virol.* 27: 1–13.
- Gyurech D, Schilling J, Schmidt-Chanasit J, Cassinotti P, Kaeppli F, Dobec M 2016. False positive dengue NS1 antigen test in a traveller with an acute Zika virus infection imported into Switzerland. *Swiss Med Wkly* 146: w14296.
- Haddow AD, Schuh AJ, Yasuda CY, Kasper MR, Heang V, Huy R, Guzman H, Tesh RB, Weaver SC 2012. Genetic Characterization of Zika Virus Strains: Geographic Expansion of the Asian Lineage (KE Olson, Ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 6: e1477.
- Halstead S, O'Rourke E 1977. Dengue viruses and mononuclear phagocytes. I. Infection enhancement by non-neutralizing antibody. *The Journal of Experimental Medicine* 146: 201–217.
- Halstead SB, Scanlon JE, Umpaivit P, Udomsakdi S 1969. Dengue and chikungunya virus infection in man in Thailand, 1962-1964. IV. Epidemiologic studies in the Bangkok metropolitan area. *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 18: 997–1021.
- Hamel R, Dejarnac O, Wichit S, Ekchariyawat P, Neyret A, Luplertlop N, Perera-Lecoin M, Surasombatpattana P, Talignani L, Thomas F, Cao-Lormeau V-M, Choumet V, Briant L, Desprès P, Amara A, Yssel H, Missé D 2015. Biology of Zika Virus Infection in Human Skin Cells. *Journal of Virology* 89: 8880–8896.
- Hayes EB 2009. Zika Virus Outside Africa. *Emerg Infect Dis* 15: 1347–1350.
- Heang V, Yasuda C, Ngan C 2011. Zika virus from fever syndromic surveillance in Cambodia. *Am J Trop Med Hyg* 85: 183.
- Heringer M 2017. Vírus dengue tipo 4 no estado do Rio de Janeiro: epidemiologia, caracterização de casos confirmados e estudos evolutivos dos vírus circulantes.
- Heringer M, Nogueira RMR, Filippis D, B AM, Lima MRQ, Faria NRC, Nunes PCG, Nogueira FB, Santos D, B F 2015. Impact of the emergence and re-emergence of different dengue viruses' serotypes in Rio de Janeiro, Brazil, 2010 to 2012. *Trans R Soc Trop Med Hyg* 109: 268–274.
- Heringer M, Souza TMA, Lima M da RQ, Nunes PCG, Faria NR da C, Bruycker-Nogueira F de, Chouin-Carneiro T, Nogueira RMR, Dos Santos FB 2017. Dengue type 4 in Rio de Janeiro, Brazil: case characterization following its introduction in an endemic region. *BMC Infect. Dis.* 17: 410.
- Hidari KIPJ, Suzuki T 2011. Dengue virus receptor. *Trop Med Health* 39: 37–43.
- Hirayama T, Mizuno Y, Takeshita N, Kotaki A, Tajima S, Omatsu T, Sano K, Kurane I, Takasaki T 2012. Detection of Dengue Virus Genome in Urine by Real-Time Reverse Transcriptase PCR: a

- Laboratory Diagnostic Method Useful after Disappearance of the Genome in Serum. *Journal of Clinical Microbiology* 50: 2047–2052.
- Hirsch A, Creighton C 1883. *Handbook of geographical and historical pathology*. London : The New Sydenham Society.
- Hunsperger EA, Yoksan S, Buchy P, Nguyen VC, Sekaran SD, Enria DA, Pelegrino JL, Vázquez S, Artsob H, Drebot M, Gubler DJ, Halstead SB, Guzmán MG, Margolis HS, Nathanson C-M, Lic NRR, Besoff KE, Kliks S, Peeling RW 2009. Evaluation of Commercially Available Anti-Dengue Virus Immunoglobulin M Tests. *Emerging Infectious Diseases* 15: 436–439.
- Ioos S, Mallet H-P, Leparac Goffart I, Gauthier V, Cardoso T, Herida M 2014. Current Zika virus epidemiology and recent epidemics. *Médecine et Maladies Infectieuses* 44: 302–307.
- Jabri B, Abadie V 2015. IL-15 functions as a danger signal to regulate tissue-resident T cells and tissue destruction. *Nature reviews. Immunology* 15: 771–783.
- Jessie K, Fong MY, Devi S, Lam SK, Wong KT 2004. Localization of Dengue Virus in Naturally Infected Human Tissues, by Immunohistochemistry and In Situ Hybridization. *The Journal of Infectious Diseases* 189: 1411–1418.
- Johansson MA, Mier-y-Teran-Romero L, Reefhuis J, Gilboa SM, Hills SL 2016. Zika and the Risk of Microcephaly. *The New England journal of medicine* 375: 1–4.
- John DV, Lin Y-S, Perng GC 2015. Biomarkers of severe dengue disease – a review. *Journal of Biomedical Science* 22: 83.
- Johnson BW, Russell BJ, Lanciotti RS 2005. Serotype-Specific Detection of Dengue Viruses in a Fourplex Real-Time Reverse Transcriptase PCR Assay. *J Clin Microbiol* 43: 4977–4983.
- Kalayanarooj S, Vaughn DW, Nimmannitya S, Green S, Suntayakorn S, Kunentrasai N, Viramitrachai W, Ratanachu-ek S, Kiatpolpoj S, Innis BL, Rothman AL, Nisalak A, Ennis FA 1997. Early clinical and laboratory indicators of acute dengue illness. *J. Infect. Dis.* 176: 313–321.
- Kam Y-W, Leite JA, Lum F-M, Tan JLL, Lee B, Judice CC, Teixeira DA de T, Andreato-Santos R, Vinolo MA, Angerami R, Resende MR, Freitas ARR, Amaral E, Junior RP, Costa ML, Guida JP, Arns CW, Ferreira LCS, Rénia L, Proença-Modena JL, Ng LFP, Costa FTM, The Zika-Unicamp Network 2017. Specific Biomarkers Associated With Neurological Complications and Congenital Central Nervous System Abnormalities From Zika Virus-Infected Patients in Brazil. *The Journal of Infectious Diseases* 216: 172–181.
- Kanlaya R, Pattanakitsakul S, Sinchaikul S, Chen S-T, Thongboonkerd V 2009. Alterations in Actin Cytoskeletal Assembly and Junctional Protein Complexes in Human Endothelial Cells Induced by Dengue Virus Infection and Mimicry of Leukocyte Transendothelial Migration. *J. Proteome Res.* 8: 2551–2562.
- Karin N, Razon H 2018. Chemokines beyond chemo-attraction: CXCL10 and its significant role in cancer and autoimmunity. *Cytokine*.
- Kautner I, Robinson MJ, Kuhnle U 1997. Dengue virus infection: Epidemiology, pathogenesis, clinical presentation, diagnosis, and prevention. *The Journal of Pediatrics* 131: 516–524.
- Kelley JF, Kaufusi PH, Nerurkar VR 2012. Dengue Hemorrhagic Fever-Associated Immunomodulators Induced via Maturation of Dengue Virus Nonstructural 4B Protein in Monocytes Modulate

Endothelial Cell Adhesion Molecules and Human Microvascular Endothelial Cells Permeability. *Virology* 422: 326–337.

- Khandia R, Munjal A, Dhama K, Karthik K, Tiwari R, Malik YS, Singh RK, Chaicumpa W 2018. Modulation of Dengue/Zika virus Pathogenicity by Antibody-Dependent enhancement and Strategies to Protect Against enhancement in Zika virus infection. *Frontiers in immunology* 9.
- Kraemer MU, Sinka ME, Duda KA, Mylne AQ, Shearer FM, Barker CM, Moore CG, Carvalho RG, Coelho GE, Van Bortel W, Hendrickx G, Schaffner F, Elyazar IR, Teng H-J, Brady OJ, Messina JP, Pigott DM, Scott TW, Smith DL, Wint GW, Golding N, Hay SI 2015. The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus* (M Jit, Ed.). *eLife* 4: e08347.
- Kuno G, Mackenzie SJ, Junglen S, Hubálek Z, Plyusnin A, Gubler JD 2017. Vertebrate Reservoirs of Arboviruses: Myth, Synonym of Amplifier, or Reality? *Viruses* 9.
- Lanciotti RS, Calisher CH, Gubler DJ, Chang GJ, Vorndam AV 1992. Rapid detection and typing of dengue viruses from clinical samples by using reverse transcriptase-polymerase chain reaction. *J Clin Microbiol* 30: 545–551.
- Lanciotti RS, Kosoy OL, Laven JJ, Panella AJ, Velez JO, Lambert AJ, Campbell GL 2007. Chikungunya Virus in US Travelers Returning from India, 2006. *Emerging Infectious Diseases* 13: 764–767.
- Lanciotti R, Kosoy O, Laven J, Velez J, Lambert A, Johnson A, Stanfield S, Duffy M 2008. Genetic and Serologic Properties of Zika Virus Associated with an Epidemic, Yap State, Micronesia, 2007. *Emerging Infectious Disease journal - CDC* 14: 1232–1239.
- Lateef A, Fisher D, Tambyah P 2007. Dengue and Relative Bradycardia - Volume 13, Number 4—April 2007 - *Emerging Infectious Disease journal - CDC*.
- Lazear HM, Govero J, Smith AM, Platt DJ, Fernandez E, Miner JJ, Diamond MS 2016. A Mouse Model of Zika Virus Pathogenesis. *Cell host & microbe* 19: 720–730.
- Lee Y-R, Liu M-T, Lei H-Y, Liu C-C, Wu J-M, Tung Y-C, Lin Y-S, Yeh T-M, Chen S-H, Liu H-S 2006. MCP-1, a highly expressed chemokine in dengue haemorrhagic fever/dengue shock syndrome patients, may cause permeability change, possibly through reduced tight junctions of vascular endothelium cells. *Journal of General Virology* 87: 3623–3630.
- Lee I-K, Liu J-W, Yang KD 2012. Fatal Dengue Hemorrhagic Fever in Adults: Emphasizing the Evolutionary Pre-fatal Clinical and Laboratory Manifestations. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 6: e1532.
- Leitmeyer KC, Vaughn DW, Watts DM, Salas R, Villalobos I, de Chacon, Ramos C, Rico-Hesse R 1999. Dengue Virus Structural Differences That Correlate with Pathogenesis. *Journal of Virology* 73: 4738–4747.
- Leyton-Jaimes MF, Kahn J, Israelson A 2018. Macrophage migration inhibitory factor: A multifaceted cytokine implicated in multiple neurological diseases. *Experimental Neurology* 301: 83–91.
- Liang G, Gao X, Gould EA 2015. Factors responsible for the emergence of arboviruses; strategies, challenges and limitations for their control. *Emerg Microbes Infect* 4: e18.
- Libraty DH, Endy TP, Hough H-SH, Green S, Kalayanarooj S, Suntayakorn S, Chansiriwongs W, Vaughn DW, Nisalak A, Ennis FA, Rothman AL 2002. Differing Influences of Virus Burden and Immune Activation on Disease Severity in Secondary Dengue-3 Virus Infections. *The Journal of Infectious Diseases* 185: 1213–1221.

- Lima M da RQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB de, Limonta D, Santos FB dos 2011. A New Approach to Dengue Fatal Cases Diagnosis: NS1 Antigen Capture in Tissues (AL Rothman, Ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 5: e1147.
- Lima M da RQ, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Santos FB dos 2010. Comparison of Three Commercially Available Dengue NS1 Antigen Capture Assays for Acute Diagnosis of Dengue in Brazil (BA Lopes da Fonseca, Ed.). *PLoS Neglected Tropical Diseases* 4: e738.
- Lin Y-L, Liu C-C, Lei H-Y, Yeh T-M, Lin Y-S, Chen RM-Y, Liu H-S 2000. Infection of five human liver cell lines by dengue-2 virus. *Journal of Medical Virology* 60: 425–431.
- Lowe R, Barcellos C, Brasil P, Cruz OG, Honório NA, Kuper H, Carvalho MS 2018. The Zika Virus Epidemic in Brazil: From Discovery to Future Implications. *International Journal of Environmental Research and Public Health* 15: 96.
- Lum F-M, Low DKS, Fan Y, Tan JLL, Lee B, Chan JKY, Rénia L, Ginhoux F, Ng LFP 2017. Zika Virus Infects Human Fetal Brain Microglia and Induces Inflammation. *Clinical Infectious Diseases* 64: 914–920.
- Lum F-M, Lye DCB, Tan JLL, Lee B, Chia P-Y, Chua T-K, Amrun SN, Kam Y-W, Yee W-X, Ling W-P, Lim VWX, Pang VJX, Lee LK, Mok EWH, Chong C-Y, Leo Y-S, Ng LFP 2018. Longitudinal Study of Cellular and Systemic Cytokine Signatures to Define the Dynamics of a Balanced Immune Environment During Disease Manifestation in Zika Virus–Infected Patients. *The Journal of Infectious Diseases*: jiy225–jiy225.
- Maciel JJ, Siqueira Júnior JB, Martelli CMT 2008. Epidemiologia e desafios no controle do dengue. *Revista de Patologia Tropical* 37: 111–130.
- Malavige GN, Ogg G 2012. Pathogenesis of severe dengue infection. *Ceylon Medical Journal* 57.
- Mangada MM, Rothman AL 2005. Altered cytokine responses of dengue-specific CD4+ T cells to heterologous serotypes. *J Immunol* 175: 2676–2683.
- Mansuy JM, Dutertre M, Mengelle C, Fourcade C, Marchou B, Delobel P, Izopet J, Martin-Blondel G Zika virus: high infectious viral load in semen, a new sexually transmitted pathogen? *The Lancet Infectious Diseases* 16: 405.
- Marianneau P, Mégret F, Olivier R, Morens DM, Deubel V 1996. Dengue 1 virus binding to human hepatoma HepG2 and simian Vero cell surfaces differs. *Journal of General Virology* 77: 2547–2554.
- Martínez Torres E 2008. Dengue. *Estudos Avançados* 22: 33–52.
- Matheus S, Boukhari R, Labeau B, Ernault V, Bremand L, Kazanji M, Rousset D 2016. Specificity of Dengue NS1 Antigen in Differential Diagnosis of Dengue and Zika Virus Infection. *Emerging Infect. Dis.* 22: 1691–1693.
- Medronho R de A 2006. Dengue fever and the urban environment. *Revista Brasileira de Epidemiologia* 9: 159–161.
- Meertens L, Labeau A, Dejarnac O, Cipriani S, Sinigaglia L, Bonnet-Madin L, Le Charpentier T, Hafirassou ML, Zamborlini A, Cao-Lormeau V-M, Couplier M, Missé D, Jouvenet N, Tabibiazar R, Gressens P, Schwartz O, Amara A 2017. Axl Mediates ZIKA Virus Entry in Human Glial Cells and Modulates Innate Immune Responses. *Cell Reports* 18: 324–333.

- Mercado M, Acosta-Reyes J, Parra E, Pardo L, Rico A, Campo A, Navarro E, Viasus D 2016. Clinical and histopathological features of fatal cases with dengue and chikungunya virus co-infection in Colombia, 2014 to 2015. *Eurosurveillance* 21.
- Miagostovich MP, Nogueira RMR, Santos FB dos, Schatzmayr HG, Araújo ESM, Vorndam V 1999. Evaluation of an IgG enzyme-linked immunosorbent assay for dengue diagnosis. *Journal of Clinical Virology* 14: 183–189.
- Michlmayr D, Andrade P, Gonzalez K, Balmaseda A, Harris E 2017. CD14+CD16+ monocytes are the main target of Zika virus infection in peripheral blood mononuclear cells in a paediatric study in Nicaragua. *Nature Microbiology* 2: 1462–1470.
- Miner JJ, Diamond MS 2017. Zika Virus Pathogenesis and Tissue Tropism. *Cell Host & Microbe* 21: 134–142.
- Mlakar J, Korva M, Tul N, Popović M, Poljšak-Prijatelj M, Mraz J, Kolenc M, Resman Rus K, Vesnaver Vipotnik T, Fabjan Vodusek V, Vizjak A, Pižem J, Petrovec M, Avšič Županc T 2016. Zika Virus Associated with Microcephaly. *New England Journal of Medicine* 374: 951–958.
- Mongkolsapaya J, Dejnirattisai W, Xu X, Vasanawathana S, Tangthawornchaikul N, Chairunsri A, Sawasdivorn S, Duangchinda T, Dong T, Rowland-Jones S, Yenchitsomanus P, McMichael A, Malasit P, Screaton G 2003. Original antigenic sin and apoptosis in the pathogenesis of dengue hemorrhagic fever. *Nat Med* 9: 921–927.
- Mongkolsapaya J, Duangchinda T, Dejnirattisai W, Vasanawathana S, Avirutnan P, Jairungsri A, Khemnu N, Tangthawornchaikul N, Chotiyarnwong P, Sae-Jang K, Koch M, Jones Y, McMichael A, Xu X, Malasit P, Screaton G 2006. T Cell Responses in Dengue Hemorrhagic Fever: Are Cross-Reactive T Cells Suboptimal? *The Journal of Immunology* 176: 3821–3829.
- Morens DM, Halstead SB 1990. Measurement of Antibody-dependent Infection Enhancement of Four Dengue Virus Serotypes by Monoclonal and Polyclonal Antibodies. *Journal of General Virology* 71: 2909–2914.
- Musso D 2015. Zika Virus Transmission from French Polynesia to Brazil. *Emerging Infectious Diseases* 21: 1887–1887.
- Musso D, Nhan T, Robin E, Roche C, Bierlaire D, Zisou K, Shan Yan A, Cao-Lormeau VM, Broult J 2014a. Potential for Zika virus transmission through blood transfusion demonstrated during an outbreak in French Polynesia, November 2013 to February 2014. *Eurosurveillance* 19.
- Musso D, Nilles EJ, Cao-Lormeau V-M 2014b. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. *Clinical Microbiology and Infection* 20: O595–O596.
- Musso D, Roche C, Nhan T-X, Robin E, Teissier A, Cao-Lormeau V-M 2015a. Detection of Zika virus in saliva. *Journal of Clinical Virology* 68: 53–55.
- Musso D, Roche C, Robin E, Nhan T, Teissier A, Cao-Lormeau V-M 2015b. Potential Sexual Transmission of Zika Virus. *Emerg Infect Dis* 21: 359–361.
- Musso D, Stramer SL, Busch MP 2016. Zika virus: a new challenge for blood transfusion. *The Lancet* 387: 1993–1994.
- Naveca FG, Pontes GS, Chang AY, Silva GAV da, Nascimento VA do, Monteiro DC da S, Silva MS da, Abdalla LF, Santos JHA, Almeida TAP de 2018. 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* 113.

- Nayar SK, Noridah O, Paranthaman V, Ranjit K, Norizah I, Chem YK, Mustafa B, Chua KB 2007. Co-infection of dengue virus and chikungunya virus in two patients with acute febrile illness. *Med. J. Malaysia* 62: 335–336.
- Neville LF, Mathiak G, Bagasra O 1997. The immunobiology of interferon-gamma inducible protein 10 kD (IP-10): A novel, pleiotropic member of the C-X-C chemokine superfamily. *Cytokine & Growth Factor Reviews* 8: 207–219.
- Nogueira RMR, Araújo JMG de, Schatzmayr HG 2007. Dengue viruses in Brazil, 1986-2006. *Rev. Panam. Salud Publica* 22: 358–363.
- Nogueira RM, Eppinghaus AL 2011. Dengue virus type 4 arrives in the state of Rio de Janeiro: a challenge for epidemiological surveillance and control. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 106: 255–256.
- Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Miagostovich MP, Lampe E, Schatzmayr HG 1990. Isolation of dengue virus type 2 in Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 85: 253–253.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Filippis AMB de, Santos FB dos, Cunha RV da, Coelho JO, Souza LJ de, Guimarães FR, Araújo ESM de, De Simone TS, Baran M, Teixeira G, Miagostovich MP 2005. Dengue virus type 3, Brazil, 2002. *Emerging Infect. Dis.* 11: 1376–1381.
- Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias M de FDB, Filho F, Costa J da, Nogueira RMR, Schatzmayr HG, Miagostovich MP, Farias M de FDB, Filho F, Costa J da 1988. Virological study of a dengue type 1 epidemic at Rio de Janeiro. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 83: 219–225.
- Nunes ML, Carlini CR, Marinowic D, Kalil Neto F, Fiori HH, Scotta MC, Zanella PLÁ, Soder RB, Costa JC da 2016a. Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil,. *Jornal de Pediatria* 92: 230–240.
- Nunes PCG, Sampaio SAF, Rodrigues da CN, Mendonça MCL, Lima MRQ, Araujo SEM, Santos FB dos, Simões JBS, Santis GB de, Nogueira RMR, Filippis AMB de 2016b. Dengue severity associated with age and a new lineage of dengue virus-type 2 during an outbreak in Rio De Janeiro, Brazil. *Journal of Medical Virology* 88: 1130–1136.
- Oehler E, Watrin L, Larre P, Lepercq-Goffart I, Lastère S, Valour F, Baudouin L, Mallet, HP, Musso D, Ghawche F 2014. Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome – case report, French Polynesia, December 2013.
- Oliveira Melo A. S., Malinger G., Ximenes R., Szejnfeld P. O., Alves Sampaio S., Bispo de Filippis A. M. 2016. Zika virus intrauterine infection causes fetal brain abnormality and microcephaly: tip of the iceberg? *Ultrasound in Obstetrics & Gynecology* 47: 6–7.
- Oliveira ÉCL de, Pontes ERJC, Cunha RV da, Fróes ÍB, Nascimento D do 2009. Hematological abnormalities in patients with dengue. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical* 42: 682–685.
- Olson JG, Ksiazek TG, Suhandiman null, Triwibowo null 1981. Zika virus, a cause of fever in Central Java, Indonesia. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* 75: 389–393.

- Ornelas AMM, Pezzuto P, Silveira PP, Melo FO, Ferreira TA, Oliveira-Szejnfeld PS, Leal JI, Amorim MMR, Hamilton S, Rawlinson WD, Cardoso CC, Nixon DF, Tanuri A, Melo AS, Aguiar RS 2017. Immune activation in amniotic fluid from Zika virus-associated microcephaly. *Ann Neurol*. 81: 152–156.
- Osanai CH, Travassos da Rosa AP, Tang AT, Amaral RS do, Passos AD, Tauil PL 1983. [Dengue outbreak in Boa Vista, Roraima. Preliminary report]. *Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo* 25: 53–54.
- PAHO 2016. Dengue: guidelines for patient care in the Region of the Americas.
- Paiva IA 2016. Envolvimento de mediadores imunológicos circulantes em pacientes com Dengue na modulação da expressão de moléculas de adesão e CD147/EMMPRIN nas células endoteliais.
- Pang T, Cardosa MJ, Guzman MG 2006. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). *Immunology and Cell Biology* 85: 43–45.
- Papa MP, Meuren LM, Coelho SVA, Lucas CG de O, Mustafá YM, Lemos Matassoli F, Silveira PP, Frost PS, Pezzuto P, Ribeiro MR, Tanuri A, Nogueira ML, Campanati L, Bozza MT, Paula Neto HA, Pimentel-Coelho PM, Figueiredo CP, Aguiar RS de, Arruda LB de 2017. Zika Virus Infects, Activates, and Crosses Brain Microvascular Endothelial Cells, without Barrier Disruption. *Frontiers in Microbiology* 8: 2557.
- Park E 2017. An investigation of Zika virus-associated microcephaly in Northeastern Brazil.
- Patterson J, Sammon M, Garg M 2016. Dengue, Zika and Chikungunya: Emerging Arboviruses in the New World. *West J Emerg Med* 17: 671–679.
- Paul D, Bartenschlager R 2015. Flaviviridae Replication Organelles: Oh, What a Tangled Web We Weave. *Annu. Rev. Virol.* 2: 289–310.
- Paupy C, Delatte H, Bagny L, Corbel V, Fontenille D 2009. *Aedes albopictus*, an arbovirus vector: From the darkness to the light. *Microbes and Infection* 11: 1177–1185.
- Pegoretti V, Baron W, Laman JD, Eisel ULM 2018. Selective Modulation of TNF–TNFRs Signaling: Insights for Multiple Sclerosis Treatment. *Frontiers in Immunology* 9: 925.
- Pellissier A 1954. Serological investigation on the incidence of neurotropic viruses in French Equatorial Africa. *Bulletin de la Societe de pathologie exotique et de ses filiales* 47: 223–227.
- Pessôa R, Patriota JV, Souza M de L de, Abd El Wahed A, Sanabani SS 2016. Detection of Zika virus in Brazilian patients during the first five days of infection – urine versus plasma. *Eurosurveillance* 21: 30302.
- Petersen LR, Jamieson DJ, Powers AM, Honein MA 2016. Zika Virus. *N Engl J Med* 374: 1552–1563.
- Phillips CR, Vinecore K, Hagg DS, Sawai RS, Differding JA, Watters JM, Schreiber MA 2009. Resuscitation of haemorrhagic shock with normal saline vs. lactated Ringer's: effects on oxygenation, extravascular lung water and haemodynamics. *Crit Care* 13: R30.
- Phommanivong V, Kanda S, Shimono T, Lamingao P, Darcy AW, Mishima N, Phaytanavanh B, Nishiyama T 2016. Co-circulation of the dengue with chikungunya virus during the 2013 outbreak in the southern part of Lao PDR. *Trop Med Health* 44.

- Phuong CXT, Nhan NT, Kneen R, Thuy PTT, Thien C van, Nga NTT, Thuy TT, Solomon T, Stepniwska K, Wills B, Dong Nai Study Group 2004. Clinical diagnosis and assessment of severity of confirmed dengue infections in Vietnamese children: is the world health organization classification system helpful? *Am. J. Trop. Med. Hyg.* 70: 172–179.
- Phuong CXT, Nhan Ngo Thi, Wills Bridget, Kneen Rachel, Ha Nguyen Thi Thanh, Mai Ta Thi Tuyet, Huynh Tran Thi Thanh, Lien Doan Thi Kim, Solomon Tom, Simpson Julie A., White Nicholas J., Farrar Jeremy J. 2002. Evaluation of the World Health Organization standard tourniquet test and a modified tourniquet test in the diagnosis of dengue infection in Viet Nam. *Tropical Medicine & International Health* 7: 125–132.
- Pinheiro TJ, Guimarães LF, Silva MTT, Soares CN 2016. Neurological manifestations of Chikungunya and Zika infections. *Arquivos de Neuro-Psiquiatria* 74: 937–943.
- Pinto LM de O, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setúbal S, Kubelka CF, Cruz OG, Oliveira SA de 2012a. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1b and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 107: 48–56.
- Pinto LM de O, Marinho CF, Póvoa TF, Azeredo EL de, Souza LA de, Barbosa LDR, Motta-Castro ARC, Alves AMB, Ávila CAL, Souza LJ de, Cunha RV da, Damasco PV, Paes MV, Kubelka CF 2012b. Regulation of Inflammatory Chemokine Receptors on Blood T Cells Associated to the Circulating Versus Liver Chemokines in Dengue Fever (P Proost, Ed.). *PLoS ONE* 7: e38527.
- Póvoa TF, Alves AMB, Oliveira CAB, Nuovo GJ, Chagas VLA, Paes MV 2014. The Pathology of Severe Dengue in Multiple Organs of Human Fatal Cases: Histopathology, Ultrastructure and Virus Replication (X Jin, Ed.). *PLoS ONE* 9: e83386.
- Prisant N, Bujan L, Benichou H, Hayot P-H, Pavili L, Lurel S, Herrmann C, Janky E, Joguet G 2016. Zika virus in the female genital tract. *The Lancet Infectious Diseases* 16: 1000–1001.
- Priyamvada L, Quicke KM, Hudson WH, Onlamoon N, Sewatanon J, Edupuganti S, Pattanapanyasat K, Chokephaibulkit K, Mulligan MJ, Wilson PC, Ahmed R, Suthar MS, Wrammert J 2016. Human antibody responses after dengue virus infection are highly cross-reactive to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 113: 7852–7857.
- Proença-Modena JL, Milanez GP, Costa ML, Judice CC, Maranhão Costa FT 2018. Zika virus: lessons learned in Brazil. *Microbes and Infection*.
- Quicke KM, Bowen JR, Johnson EL, McDonald CE, Ma H, O’Neal JT, Rajakumar A, Wrammert J, Rimawi BH, Pulendran B, Schinazi RF, Chakraborty R, Suthar MS 2016. Zika Virus Infects Human Placental Macrophages. *Cell host & microbe* 20: 83–90.
- Rabelo K, Souza R, Souza L de, Louvain T, Santos FB, Guerra P, Azeredo E, Salomão N, Trindade G, Basílio-de-Oliveira C, Carvalho J de, Medina-Acosta E, Paes M 2017. Placental Histopathology and Clinical Presentation of Severe Congenital Zika Syndrome in a Human Immunodeficiency Virus-Exposed Uninfected Infant. *Frontiers in Immunology* 8: 1704.
- Raeber ME, Zurbuchen Y, Impellizzeri D, Boyman O 2018. The role of cytokines in T-cell memory in health and disease. *Immunological Reviews* 283: 176–193.
- Rathakrishnan A, Wang SM, Hu Y, Khan AM, Ponnampalavanar S, Lum LCS, Manikam R, Sekaran SD 2012. Cytokine Expression Profile of Dengue Patients at Different Phases of Illness (EG Kallas, Ed.). *PLoS ONE* 7: e52215.

- Remy MM 2014. Dengue fever: theories of immunopathogenesis and challenges for vaccination. *Inflamm Allergy Drug Targets* 13: 262–274.
- Rigau-Pérez JG 2006. Severe dengue: the need for new case definitions. *Lancet Infect Dis* 6: 297–302.
- Rigau-Pérez JG, Clark GG, Gubler DJ, Reiter P, Sanders EJ, Vance Vorndam A 1998. Dengue and dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 352: 971–977.
- Roberts DJ, Frosch MP 2016. Zika and histopathology in first trimester infections. *The Lancet* 388: 847–849.
- Rodriguez-Morales AJ, Bandeira AC, Franco-Paredes C 2016. The expanding spectrum of modes of transmission of Zika virus: a global concern. *Annals of Clinical Microbiology and Antimicrobials* 15: 13.
- Rothman AL 2011. Immunity to dengue virus: a tale of original antigenic sin and tropical cytokine storms. *Nature Reviews Immunology* 11: 532.
- Rush B 1780. An account of the bilious remitting fever: As it appeared in philadelphia, in the summer and autumn of the year 1780. *American Journal of Medicine*: 104–117.
- Salvador FS, Fujita DM 2016. Entry routes for Zika virus in Brazil after 2014 world cup: New possibilities. *Travel Medicine and Infectious Disease* 14: 49–51.
- Sam S-S, Omar SFS, Teoh B-T, Abd-Jamil J, AbuBakar S 2013. Review of Dengue Hemorrhagic Fever Fatal Cases Seen Among Adults: A Retrospective Study. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7: e2194.
- Samanta J, Sharma V 2015. Dengue and its effects on liver. *World J Clin Cases* 3: 125–131.
- Sangkawibha N, Rojanasuphot S, Ahandrik S, Viriyapongse S, Jatanasen S, Salitul V, Phanthumachinda B, Halstead SB 1984. Risk factors in dengue shock syndrome: a prospective epidemiologic study in Rayong, Thailand. I. The 1980 outbreak. *Am J Epidemiol* 120: 653–669.
- Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT da, Schatzmayr HG, Nogueira RMR, Rosa APAT da 1986. An outbreak of dengue virus at Rio de Janeiro - 1986. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 81: 245–246.
- Schmitz L, Prayag S, Varghese S, Jog S, Bhargav-Patil P, Yadav A, Salunke D, Vincent J-L 2011. Nonhematological organ dysfunction and positive fluid balance are important determinants of outcome in adults with severe dengue infection: A multicenter study from India. *Journal of Critical Care* 26: 441–448.
- Schuler-Faccini L 2016. Possible association between Zika virus infection and microcephaly—Brazil, 2015. *MMWR. Morbidity and mortality weekly report* 65.
- Schulte W, Bernhagen J, Bucala R 2013. Cytokines in Sepsis: Potent Immunoregulators and Potential Therapeutic Targets—An Updated View. *Mediators of Inflammation* 2013: 165974.
- Screaton G, Mongkolsapaya J, Yacoub S, Roberts C 2015. New insights into the immunopathology and control of dengue virus infection. *Nat. Rev. Immunol.* 15: 745–759.
- Sheridan MA, Yunusov D, Balaraman V, Alexenko AP, Yabe S, Verjovski-Almeida S, Schust DJ, Franz AW, Sadovsky Y, Ezashi T, Roberts RM 2017. Vulnerability of primitive human placental

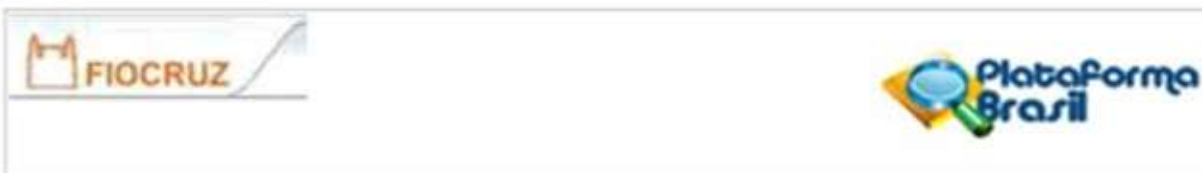
trophoblast to Zika virus. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 114: E1587–E1596.

- Shuaib W, Stanazai H, Abazid AG, Mattar AA 2016. Re-Emergence of Zika Virus: A Review on Pathogenesis, Clinical Manifestations, Diagnosis, Treatment, and Prevention. *Am. J. Med.* 129: 879.e7-879.e12.
- Smithburn KC 1952. Neutralizing Antibodies Against Certain Recently Isolated Viruses in the Sera of Human Beings Residing in East Africa. *J. Immunol.* 69: 223.
- Soares de Souza A, Moraes Dias C, Braga FDCB, Terzian ACB, Estofolete CF, Oliani AH, Oliveira GH, Brandão de Mattos CC, Mattos LC de, Nogueira ML, Vaz-Oliani DCM 2016. Fetal Infection by Zika Virus in the Third Trimester: Report of 2 Cases. *Clinical Infectious Diseases* 63: 1622–1625.
- Srichaikul T, Nimmannitya S 2000. Haematology in dengue and dengue haemorrhagic fever. *Baillieres Best Pract. Res. Clin. Haematol.* 13: 261–276.
- Srikiatkachorn A, Green S 2010. Markers of Dengue Disease Severity. In: Rothman AL (Ed.), *Dengue Virus, Current Topics in Microbiology and Immunology*. Springer Berlin Heidelberg, pp. 67–82.
- Srikiatkachorn A, Krautrachue A, Ratanaprakarn W, Wongtapradit L, Nithipanya N, Kalayanarooj S, Nisalak A, Thomas SJ, Gibbons RV, Mammen MP, Libraty DH, Ennis FA, Rothman AL, Green S 2007. Natural History of Plasma Leakage in Dengue Hemorrhagic Fever: A Serial Ultrasonographic Study. *The Pediatric Infectious Disease Journal* 26: 283–290.
- Srikiatkachorn A, Rothman AL, Gibbons RV, Sittisombut N, Malasit P, Ennis FA, Nimmannitya S, Kalayanarooj S 2011. Dengue—How Best to Classify It. *Clin Infect Dis* 53: 563–567.
- Stettler K, Beltramello M, Espinosa DA, Graham V, Cassotta A, Bianchi S, Vanzetta F, Minola A, Jaconi S, Mele F, Foglierini M, Pedotti M, Simonelli L, Dowall S, Atkinson B, Percivalle E, Simmons CP, Varani L, Blum J, Baldanti F, Cameroni E, Hewson R, Harris E, Lanzavecchia A, Sallusto F, Corti D 2016. Specificity, cross-reactivity, and function of antibodies elicited by Zika virus infection. *Science* 353: 823.
- Talavera D, Castillo AM, Dominguez MC, Gutierrez AE, Meza I 2004. IL8 release, tight junction and cytoskeleton dynamic reorganization conducive to permeability increase are induced by dengue virus infection of microvascular endothelial monolayers. *Journal of General Virology* 85: 1801–1813.
- Tang H, Hammack C, Ogden SC, Wen Z, Qian X, Li Y, Yao B, Shin J, Zhang F, Lee EM, Christian KM, Didier RA, Jin P, Song H, Ming G 2016. Zika Virus Infects Human Cortical Neural Precursors and Attenuates Their Growth. *Cell stem cell* 18: 587–590.
- Tappe D, Rissland J, Gabriel M, Emmerich P, Gunther S, Held G, Smola S, Schmidt-Chanasit J 2014. First case of laboratory-confirmed Zika virus infection imported into Europe, November 2013. *Euro Surveill.* 19.
- Tauil PL 2001. Urbanização e ecologia do dengue. *Cadernos de Saúde Pública* 17: S99–S102.
- Teixeira MG, Costa M da CN, Barreto F, Barreto ML 2009. Dengue: twenty-five years since reemergence in Brazil. *Cadernos de Saúde Pública* 25: S7–S18.

- Temporão JG, Penna GO, Carmo EH, Coelho GE, Socorro Silva Azevedo R do, Teixeira Nunes MR, Costa Vasconcelos PF da 2011. Dengue virus serotype 4, Roraima State, Brazil. *Emerging Infect. Dis.* 17: 938–940.
- Terzian ACB, Schanoski AS, Mota MT de O, Silva RA da, Estofolete CF, Colombo TE, Rahal P, Hanley KA, Vasilakis N, Kalil J, Nogueira ML 2017. Viral Load and Cytokine Response Profile Does Not Support Antibody-Dependent Enhancement in Dengue-Primed Zika Virus-Infected Patients. *Clinical Infectious Diseases* 65: 1260–1265.
- Thomas SJ, Martinez LJ, Endy TP 2014. Flaviviruses: Yellow Fever, Japanese B, West Nile, and Others. In: Kaslow RA, Stanberry LR, Le Duc JW (Eds.), *Viral Infections of Humans: Epidemiology and Control*, Springer US, Boston, MA, pp. 383–415.
- Tognarelli J, Ulloa S, Villagra E, Lagos J, Aguayo C, Fasce R, Parra B, Mora J, Becerra N, Lagos N, Vera L, Olivares B, Vilches M, Fernández J 2016. A report on the outbreak of Zika virus on Easter Island, South Pacific, 2014. *Archives of Virology* 161: 665–668.
- Torrentes-Carvalho A, Azeredo EL, Reis SR, Miranda AS, Gandini M, Barbosa LS, Kubelka CF 2009. Dengue-2 infection and the induction of apoptosis in human primary monocytes. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 104: 1091–1099.
- Valle D, Pimenta DN, Cunha RV da 2015. *Dengue: teorias e práticas*. SciELO-Editora FIOCRUZ.
- Vasconcelos PF da C 2015. Doença pelo vírus Zika: um novo problema emergente nas Américas? *Revista Pan-Amazônica de Saúde* 6: 9–10.
- Vasilakis N, Weaver SC 2008. Chapter 1 The History and Evolution of Human Dengue Emergence. In: *Advances in Virus Research*, Academic Press, pp. 1–76.
- Villamil-Gómez WE, Rodríguez-Morales AJ, Uribe-García AM, González-Arismendy E, Castellanos JE, Calvo EP, Álvarez-Mon M, Musso D 2016. Zika, dengue, and chikungunya co-infection in a pregnant woman from Colombia. *International Journal of Infectious Diseases* 51: 135–138.
- Waggoner JJ, Gresh L, Vargas MJ, Ballesteros G, Tellez Y, Soda KJ, Sahoo MK, Nuñez A, Balmaseda A, Harris E, Pinsky BA 2016. Viremia and Clinical Presentation in Nicaraguan Patients Infected With Zika Virus, Chikungunya Virus, and Dengue Virus. *Clinical Infectious Diseases: An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America* 63: 1584–1590.
- Watts DM, Porter KR, Putvatana P, Vasquez B, Calampa C, Hayes CG, Halstead SB 1999. Failure of secondary infection with American genotype dengue 2 to cause dengue haemorrhagic fever. *The Lancet* 354: 1431–1434.
- Weaver SC, Vasilakis N 2009. Molecular Evolution of Dengue Viruses: Contributions of Phylogenetics to Understanding the History and Epidemiology of the Preeminent Arboviral Disease. *Infect Genet Evol* 9: 523–540.
- WHO 2009. *Dengue: Guidelines for Diagnosis, Treatment, Prevention and Control: New Edition*. World Health Organization, Geneva.
- WHO 2016a. Zika virus, microcephaly and Guillain-Barré syndrome situation report.
- WHO 2016b. World Health Organization. Prevention of sexual transmission of Zika virus: interim guidance update.
- WHO 2017. WHO | Dengue and severe dengue. *WHO*.

- Wong P-SJ, Li MI, Chong C-S, Ng L-C, Tan C-H 2013. *Aedes (Stegomyia) albopictus* (Skuse): A Potential Vector of Zika Virus in Singapore. *PLOS Neglected Tropical Diseases* 7: e2348.
- Yacoub S, Mongkolsapaya J, Sreaton G 2016. Recent advances in understanding dengue. *F1000Research* 5: F1000 Faculty Rev-78.
- Zanluca C, Dos Santos CND 2016. Zika virus - an overview. *Microbes Infect.* 18: 295–301.
- Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K, Zanluca C, Melo VCA de, Mosimann ALP, Santos GIV dos, Santos CND dos, Luz K 2015. First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. *Memórias do Instituto Oswaldo Cruz* 110: 569–572.

IX. ANEXO A - APROVAÇÃO NO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Titulo da Pesquisa: Estudo imunológico e genético durante a febre do dengue

Pesquisador: Claire Fernandes Kubeka

CAAE: 13318113.7.0000.5248

Instituição Proponente: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

Patrocinador Principal: Fundação Oswaldo Cruz - FIOCRUZ/IOC

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 495.688

Data da Relatoria: 15/12/2013

Apresentação do Projeto:

Os autores pretendem estudar mecanismos fisiopatológicos da dengue, mais especificadamente, fatores imunológicos e genéticos relevantes à regulação da resposta antiviral e à patogênese da doença. No objetivo primário é descrito que o estudo reúne duas vertentes. Entretanto, são identificáveis três grandes estudos que se complementam.

São apresentados quatro objetivos e treze objetivos secundários.

O primeiro estudo é de caso-controle, considerando casos pacientes com manifestações clínicas indicadoras de gravidade (manifestações neurológicas e/ou co-morbidades) e controles pacientes sem estes sintomas. Os voluntários serão recrutados de bancos de dados dos centros participantes da pesquisa (UFMS e UPE) semelhante ao realizado pelo centro do RJ. Pretende-se determinar o perfil de citocinas e o perfil genético a fim de identificar biomarcadores específicos de gravidade através da correlação entre polimorfismo no gene e regulação da proteína como marcador de gravidade.

O segundo estudo é longitudinal, avaliando voluntários jovens na fase aguda da doença. Amostras de voluntários na fase aguda da doença serão processadas imediatamente ou estocadas nas instituições participantes do estudo, a fim de comparar a resposta imunológica de fase aguda com

Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Expansão)

Bairro: Manginhos

CEP: 21.040-360

UF: RJ

Município: RIO DE JANEIRO

Telefone

:

(21)3882-9011

Fax: (21)2561-4815

E-mail: cepfocruz@ioc.fiocruz.br



FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ -
FIOCRUZ/IOC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR EM APOIO À INVESTIGAÇÃO DESTAS ARBOVIROSES NO BRASIL

Pesquisador: FLAVIA BARRETO DOS SANTOS

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 57221416.0.1001.5248

Instituição Proponente: FUNDACAO OSWALDO CRUZ

Patrocinador Principal: FUN CARLOS CHAGAS F. DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DO RIO DE JANEIRO - FAPERJ
FUNDACAO OSWALDO CRUZ

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.920.256

Apresentação do Projeto:

"As epidemias causadas por dengue, chikungunya e zika constituem um sério problema de Saúde Pública brasileira, com grande impacto para sociedade. Dadas às limitadas opções de prevenção e controle, é demonstrado que o diagnóstico laboratorial possui um papel fundamental para o tratamento oportuno dos pacientes. Os quatro sorotipos de DENV variam em termos de patogenicidade e virulência, e a imunopatologia da doença pode estar diretamente associada ao vírus, às diferenças nos sorotipos e genótipos. O CHIKV introduzido no país é conhecido por causar uma doença considerada benigna até então, porém, apresentações atípicas e complicações neurológicas, cardíacas, renais, oculares e de pele, já foram reportadas. A infecção pelo ZIKV não era associada a complicações grave, no entanto, relatos da síndrome de Guillain-Barré foram descritos. O aumento significativo de casos de microcefalia em fetos, possivelmente associada à infecção pelo ZIKV foi reportado. O presente Projeto é resultante da formação de uma Rede proposta que visa atender às demandas emergenciais de enfrentamento do dengue, zika e chikungunya no âmbito da Saúde Pública nacional e propõe uma abordagem multidisciplinar que contribua nas áreas da vigilância epidemiológica, aspectos clínicos, diagnóstico laboratorial, fisiopatologia das infecções e desenvolvimento tecnológico. A integração entre a rede ocorrerá

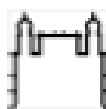
Endereço: Av. Brasil 4036, Sala 705 (Campus Expansão)

Bairro: Manguinhos **CEP:** 21.040-360

UF: RJ **Município:** RIO DE JANEIRO

Telefone: (21)3882-9011 **Fax:** (21)2561-4815 **E-mail:** cepfiocruz@ioc.fiocruz.br

X. ANEXO B - FICHA CLÍNICA E EPIDEMIOLÓGICA



Projeto Dengue, Zika e Chikungunya.
Projeto Imunologia Viral – FIOCRUZ
Projeto Mato Grosso do Sul 2016

PRONTUÁRIO:

FICHA DE REQUISIÇÃO DE EXAME LABORATORIAL *PREENCHER EM LETRA DE FORMA			
Unidade de atendimento:		E-mail:	
Nome do paciente:			
Endereço:			
Bairro:	Município:	Estado:	
Telefone:	Data de nascimento:	Idade:	
Sexo: () F () M	Ocupação:	Gestante: () SIM _____ () NÃO () Microcefalia/Malformação	
Vacinado contra Febre Amarela? () Sim – Data: ____/____/____ () Não	Teve dengue antes? () Sim – Data: ____/____/____ () Não () Não sabe		
Outras vacinas?			
SUSPEITA: () DENGUE () ZIKA () CHIKUNGUNYA			
DADOS CLÍNICOS			
Data do início dos sintomas: ____/____/____			
Data da 1ª coleta: ____/____/____		Data da 2ª coleta: ____/____/____	
Espécime coletado: () Soro () Sangue () Tecido especificar:			
MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS			
() Febre _____ °C	() Vômitos	() Dor abdominal	
() Cefaleia	() Náuseas	() Artrite	
() Prostração	() Diarréia	() Volemia	
() Astenia	() Exantema	() Hiperemia conjuntival	
() Parestesia	() Edema	() Tontura/vertigem	
() Mialgia	() Prurido	() Tosse	
() Artralgia	() Epigastria	() Icterícia	
() Lombalgia	() Adenomegalia	() Alteração transaminases	
() Dor retro-orbitária	() Plaquetopenia		
() Anorexia	() Leucopenia		
COMPLICAÇÕES – SINAIS DE ALARME			
Ocorreu hospitalização: () Sim () Não		Data de internação: ____/____/____	
Nome do hospital:			
NO CASO DE COMPLICAÇÕES ESPECIFICAR:			
() Alterações neurológicas	() Plaquetopenia < 50.000/mm ³	() Leucopenia < 1.000/mm ³	() Choque
() Distúrbio cardiorrespiratório	() Hemorragia digestiva	() Dor Abdominal persistente	() Alteração Sist. Nervoso Central
() Insuficiência hepática	() Derrames cavitários	() Ascite	
() Sangramento espontâneo	() Sangramento volumoso	() Vômitos persistentes	
() Hepatomegalia	() Derrame Pleural	() Derrames Pericárdio	
() Hipotensão Postural	() Hipotensão Arterial	() Hemococentração	() ÓBITO Data do óbito: ____/____/____
Outros:			
MANIFESTAÇÕES HEMORRÁGICAS			
() Prova do laço positiva	() Petéquias	() Gengivorragia	() Epistaxe
() Metrorragia			
Exames laboratoriais solicitados:			
() Sorologia	() RT-PCR* - Dengue – Zika (até o 5º dia de doença após o início dos sintomas) Chikungunya (até o 8 dia de doença após o início dos sintomas)		
() Isolamento viral			

COMORBIDADES		
<input type="checkbox"/> Artrite reumatóide		
<input type="checkbox"/> Diabetes mellitus		
<input type="checkbox"/> DPOC		
<input type="checkbox"/> Asma brônquica		
<input type="checkbox"/> Hipertensão arterial		
<input type="checkbox"/> Doença cardíaca		
<input type="checkbox"/> Doença faloiforme		
<input type="checkbox"/> Doença auto-imune		
<input type="checkbox"/> Tabagismo		
<input type="checkbox"/> Rinite		
<input type="checkbox"/> Doença Viral Crônica?	Qual? _____	
<input type="checkbox"/> Faz uso de medicamento contínuo?	Especificar: _____	
Dados laboratoriais:		
1º HT: _____ %	1ª Plaqueta: _____ mm ³ Data: ____/____/____	
2º HT: _____ %	2ª Plaqueta: _____ mm ³ Data: ____/____/____	
3º HT: _____ %	3ª Plaqueta: _____ mm ³ Data: ____/____/____	
Anexar dados do hemograma e bioquímica		
Outras informações:		
Requerente:		
_____	_____	_____
Nome/Carimbo/CR	Assinatura	Data de Coleta
Entrevistador:	Data da entrevista:	

XI. ANEXO C - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ
Ministério da Saúde

Laboratório de Imunologia Viral
Rav. Helio e Peggy Pereira, salas B118 e B119

ANEXO I – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO COLETA DE AMOSTRA PARA A DETECÇÃO DE DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA

PROJETO DE PESQUISA: DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA: UMA ABORDAGEM MULTIDISCIPLINAR EM APOIO À INVESTIGAÇÃO DESTAS ARBOVIROSES NO BRASIL EM MICROCEFALIA ASSOCIADA À INFECÇÃO PELO VÍRUS ZIKA: UMA ABORDAGEM TRANSDISCIPLINAR		
OBJETIVO: ENTENDER OS ASPECTOS DO DENGUE, ZIKA E CHIKUNGUNYA EM PACIENTES DOENTES.		
INVESTIGADORES	Dra Flavia Barreto dos Santos	Tel:(21) 99808-0399; flaviab@ioc.fiocruz.br
	Dra Euzenides Leal de Azeredo	Tel: (21) 97183-9093; ezuzenides@ioc.fiocruz.br
	Dra Luiza de Oliveira Rimb	Tel: (21) 987557771; lrimb@ioc.fiocruz.br
	Dr Luiz José de Souza (Hospital Plantadores de Cereja, Campos dos Goytacazes)	Tel: (22) 9883-1-868; luizjosedes@gmail.com
	Dr Paulo Vieira Damascio (Hospital Rio Laranjeiras HUGO)	Tel: (21) 99528-2005;paulovieiradamascio@gmail.com
	Dr Rivaldo Venâncio da Cunha (UFMS)	Tel: (67) 9327-4444; rivaldo_venancio@uol.com.br
Dra Patricia Brasil (IOC/Fiocruz)	Tel: (21) 98874-4443; patricia.brasil@ioc.fiocruz.br	
<i>Em caso de necessidade, por favor contatar os investigadores por esta pesquisa (pode ser feita ligação à cobrar)</i>		

O convite a sua participação voluntária deste estudo se deve a investigação do vírus da dengue, chikungunya, zika no seu sangue, e/ou na urina, e/ou na saliva, para obter mais conhecimentos sobre estas doenças.

Você passará por atendimento médico e após a avaliação do médico o seu sangue será retirado para saber se tem dengue ou chikungunya ou zika. O médico poderá pedir para que retome para ver se está melhor, mas você pode se recusar a voltar.

Esta pesquisa poderá não trazer benefícios imediatos para minha doença, mas poderão no futuro beneficiar outras pessoas. Você receberá os resultados de todos os exames no prazo de até 2 meses. Entraremos em contato por telefone ou por email para avisarmos quando o seu exame tiver pronto. Você poderá optar pela entrega dos resultados por email ou no local onde foi feito o atendimento.

Retiraremos no máximo 20 mL de sangue da sua veia. O seu sangue será usado para sabermos se você está com dengue, chikungunya ou zika. Também faremos o hemograma completo, que diz a quantidade de leucócitos, conhecida também como células brancas do sangue, e a quantidade de hemácias, células vermelhas do sangue e a quantidade de plaquetas. Em algumas pessoas pediremos também 1mL de saliva e 10 mL de urina. Iremos fornecer um pote para coletar até 10mL da sua urina. A saliva será retirada com coletor que parece um cotonete grande, onde retiraremos no máximo 1mL da sua saliva. Faremos estes testes para conhecer a sua doença. A QUANTIDADE DE SANGUE, URINA E SALIVA RETIRADAS SÃO POUCAS EM RELAÇÃO A QUANTIDADE QUE VOCÊ POSSUIE SUARETIRADO NÃO VA PREJUDICAR.

Seu sangue, urina e saliva, serão guardados no Laboratório da Fiocruz por até 10 anos, sob a responsabilidade dos pesquisadores descritos acima, para ser utilizado para pesquisas futuras, mas se não concordar, você pode pedir a qualquer momento que o sangue seja jogado fora. Após esse período jogaremos fora o seu sangue, saliva e urina.

A retirada do sangue será feita por um enfermeiro ou técnico especializado. Os possíveis desconfortos, se ocorrerem, são dor no local e/ou ficar roxo no local onde foi retirado o sangue, com duração de 3 a 7 dias. Todos os cuidados serão tomados, como uso de seringa, agulha e gaze descartáveis e álcool para limpeza local.

O resultado deste estudo é confidencial, podendo ser divulgados cientificamente. Entretanto ninguém saberá que aquele resultado é seu, pois não será permitida sua identificação, garantindo sua privacidade.

Os pesquisadores do projeto se colocam à disposição para responder suas perguntas sempre que tiver novas dúvidas, em qualquer momento.

SUA PARTICIPAÇÃO NESTE ESTUDO É INTEIRAMENTE VOLUNTÁRIA, E É LIVRE PARA RECUSAR A PARTICIPAR NO ESTUDO, OU SE RETIRAR EM QUALQUER FASE DA PESQUISA SEM QUE ISSO POSSA AFETAR OU PREJUDICAR O CUIDADO MÉDICO.

Assinatura aqui

Pela sua participação no estudo, você não receberá qualquer valor em dinheiro e terá a garantia de que, todas as despesas necessárias para a realização da pesquisa, não serão de sua responsabilidade.



Instituto Oswaldo Cruz – IOC/FIOCRUZ
Ministério da Saúde

Laboratório de Imunologia Viral
Rav. Hélio e Peggy Pereira, salas B118 e B119

Você não terá qualquer despesa por participar da pesquisa.

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fiocruz (CEP Fiocruz) analisa e avalia projetos de pesquisa envolvendo seres humanos, a fim de garantir que as pesquisas atendam aos fundamentos éticos, científicos e ao cumprimento das Resoluções do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP). Fica localizado na Avenida Brasil, 4036, sala 705 - Campus Expansão - Manginhos - Tel.: (21) 38829011 (O CEP não aceita chamadas a cobrar) - email cepfiocruz@ioc.fiocruz.br.

Este termo é redigido, em duas vias, sendo uma para você e a outra para o pesquisador. Todas as páginas deverão ser rubricadas por você e pelo pesquisador responsável.

Nome : _____

Email: _____ Telefone: _____

Eu, entendi tudo que foi informado sobre a pesquisa e autorizo a minha participação com o voluntário neste estudo.
Além disso,

- Autorizo o armazenamento e a utilização do material biológico coletado para estudos futuros.
 Não autorizo o armazenamento da minha amostra para estudos futuros.

Data: _____

Assinatura : _____

Pesquisador

Laboratório de Imunologia Viral (IOC/FIOCRUZ)
Avenida Brasil 4365, Pavilhão Hélio Peggy Pereira (HPP) 1º andar, sala B118, Manginhos, Rio de Janeiro/RJ
Tel: (21) 2562-1782

XII. ANEXO D – ARTIGOS PUBLICADOS

1. Artigo científico com resultados incluídos na dissertação

Clínical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil Azeredo EL, dos Santos FB, Barbosa LS, Souza TMA, Badolato-Corrêa J, Sánchez-Arcila JC, Nunes PCG, de-Oliveira-Pinto LM, de Filippis AM, Dal Fabbro M, Hoscher Romanholi I, Venancio da Cunha R.. PLOS Currents Outbreaks. 2018Feb15 doi:0.1371/currents.outbreaks.0bf6aeb4d30824de63c4d5d745b217f5.

2. Artigos publicados em colaboração durante o período do mestrado

Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection. Badolato-Corrêa, J. , Sánchez-Arcila, J. C., Alves de Souza, T. M., Santos Barbosa, L. Conrado Guerra Nunes, P. , da Rocha Queiroz Lima, M. , Gandini, M. , Bispo de Filippis, A. M., Venâncio da Cunha, R. , Leal de Azeredo, E. and de-Oliveira-Pinto, L. M. (2018), Immunity, Inflammation and Disease, 6: 194-206. doi:[10.1002/iid3.203](https://doi.org/10.1002/iid3.203)

First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil Souza TMA, Azeredo EL, Badolato-Corrêa J, Damasco PV, Santos C, Petitinga-Paiva F, Nunes PCG, Barbosa LS, Cipitelli MC, Chouin-Carneiro T, Faria NRC, Nogueira RMR, de Bruycker-Nogueira F, dos Santos FB.. PLOS Currents Outbreaks. 2017 Feb 14 . Edition 1. doi: 10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727.

Clinical and Laboratory Profile of Zika and Dengue Infected Patients: Lessons Learned From the Co-circulation of Dengue, Zika and Chikungunya in Brazil

[Elzinandes Leal Azeredo](#), [Flavia Barreto dos Santos](#), [Luciana Santos Barbosa](#), [Thiara Manuele Alves Souza](#), [Jessica Badolato-Corrêa](#), [Juan Camilo Sánchez-Arcila](#), [Priscila Conrado Guerra Nunes](#), [Luzia Maria de-Oliveira-Pinto](#), [Ana Maria de Filippis](#), [Márcia Dal Fabbro](#), [Izilyanne Hoscher Romanholi](#), and [Rivaldo Venancio da Cunha](#)

Elzinandes Leal Azeredo, Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; [Contributor Information](#).

[Copyright](#) © 2018 Azeredo, dos Santos, Barbosa, Souza, Badolato-Corrêa, Sánchez-Arcila, Nunes, de-Oliveira-Pinto, de Filippis, Dal Fabbro, Hoscher Romanholi, Venancio da Cunha, et al

This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](#), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Abstract

Go to:

Background: The current triple epidemic caused by dengue, zika and chikungunya constitutes a serious health problem in Brazil. The aim of this study was to investigate acute samples (up to the 7 days of symptoms) from patients presenting acute fever syndrome suspected as arboviral infection and characterize the clinical and laboratorial profile during the co-circulation of dengue, zika and chikungunya in Campo Grande, Mato Grosso do Sul (MS), midwest region of Brazil. **Methods:** All suspected cases (n=134) were tested by using serological and molecular diagnostic tests including DENV, ZIKV and CHIKV RT-PCR, Dengue nonstructural protein 1

Human T cell responses to Dengue and Zika virus infection compared to Dengue/Zika coinfection

Jessica Badolato-Corrêa¹, Juan Camilo Sánchez-Arcila¹, Thiara Manuele Alves de Souza¹, Luciana Santos Barbosa^{1*}, Priscila Conrado Guerra Nunes¹, Monique da Rocha Queiroz Lima¹, Mariana Gandini², Ana Maria Bispo de Filippis³, Rivaldo Venâncio da Cunha^{4,5}, Elzinandes Leal de Azeredo¹, & Luzia Maria de-Oliveira-Pinto¹

¹Laboratory of Viral Immunology, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

²Laboratory

of Genetics, Institute of Pediatrics and Puericulture Martagoz Gesteira (PRMG), Federal University of Rio de Janeiro, UFRJ, Rio de Janeiro, Brazil

³Laboratory of Cellular Microbiology, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁴Laboratory of Flaviviruses, Fundação Oswaldo Cruz, Instituto Oswaldo Cruz, Rio de Janeiro, Brazil

⁵Department of Clinical Medicine, Universidade Federal do Mato Grosso do Sul, Brazil

*Fundação Oswaldo Cruz, Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brazil

Keywords

Dengue, Zika, T lymphocytes

Correspondence

Luzia Maria de-Oliveira-Pinto, PhD,
Laboratório de Imunologia Viral, sala 8115,
Pavilhão Hélio & Pappy Pereira, Fundação
Oswaldo Cruz,
Instituto Oswaldo Cruz, Avenida Brasil, 4685,
Marquinhos, ZIP: 21045-900, Rio de Janeiro, Brazil.
Tel: +55(21)2562-1732;
E-mail: lmp@ioc.fiocruz.br,
lmp@ocp.ufrj.br

Funding Information

This work was financially supported by IOC/FOCRUZ and FAPERJ. Juan Camilo Sanchez-Arcila is recipient of Post-doctoral fellowship FAPERJ E-26/202.011/2016.

Received: 1 August 2017; Revised: 13 September 2017; Accepted: 4 October 2017
Final version published online 28 December 2017

Immunity, Inflammation and Disease
2018; 8(2): 184–206

doi: 10.1002/idd3.208

Jessica Badolato-Corrêa and Juan Camilo Sánchez-Arcila contributed equally to this work.

Introduction

Dengue virus (DENV) and Zika virus (ZIKV) belong to Flaviviridae family and both diseases affect significantly

Abstract

Introduction: Zika virus (ZIKV) and dengue virus (DENV) co-circulated during latest outbreaks in Brazil, hence, it is important to evaluate the host cross-reactive immune responses to these viruses. So far, little is known about human T cell responses to ZIKV and no reports detail adaptive immune responses during DENV/ZIKV coinfection.

Methods: Here, we studied T cells responses in well-characterized groups of DENV, ZIKV, or DENV/ZIKV infected patients and DENV-exposed healthy donors. We evaluated chemokine receptors expression and single multifunctional frequencies of IFN γ , TNF, and IL-2-producing T cells during these infections. Even without antigenic stimulation, it was possible to detect chemokine receptors and IFN γ , TNF, and IL-2-producing T cells from all individuals by flow cytometry. Additionally, PBMCs' IFN γ response to DENV NS1 protein and to polyclonal stimuli was evaluated by ELISPOT.

Results: DENV and ZIKV infections and DENV/ZIKV coinfections similarly induced expression of CCR5, CX3CR1, and CXCR3 on CD4 and CD8 T cells. DENV/ZIKV coinfection decreased the ability of CD4⁺ T cells to produce IFN γ , TNF, TNF⁺IFN γ , and TNF⁺IL-2, compared to DENV and ZIKV infections. A higher magnitude of IFN γ response to DENV NS1 was found in donors with a history of dengue infection, however, a hyporesponsiveness was found in acute DENV, ZIKV, or DENV/ZIKV infected patients, even previously infected with DENV.

Conclusion: Therefore, we emphasize the potential impact of coinfection on the immune response from human hosts, mainly in areas where DENV and ZIKV cocirculate.

human health. These viruses are mainly transmitted by *Aedes aegypti* or *albopictus* infected mosquitoes. Other routes of infection, including sexual, maternal, and blood transfusions, have been recently reported for ZIKV [1]. DENV

© 2017 The Authors. Immunity, Inflammation and Disease Published by John Wiley & Sons Ltd. This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

doi: [10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727](https://doi.org/10.1371/currents.outbreaks.4200119978d62ccaa454599cd2735727) Research Article

PMCID: PMC5325710 PMID: [28286701](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28286701/)

First Report of the East-Central South African Genotype of Chikungunya Virus in Rio de Janeiro, Brazil

[Thiara Manuele Alves Souza](#), [Elzinandes Leal Azeredo](#), [Jessica Badolato-Corrêa](#), [Paulo Vieira Damasco](#), [Carla Santos](#),

[Fabienne Petitinga-Paiva](#), [Priscila Conrado Guerra Nunes](#), [Luciana Santos Barbosa](#), [Márcio Costa Cipitelli](#), [Thais Chouin-Carneiro](#), [Nieli Rodrigues Costa Faria](#), [Rita Maria Ribeiro Nogueira](#), [Fernanda de Bruycker-Nogueira](#), and [Flavia Barreto dos Santos](#)

Thiara Manuele Alves Souza, Viral Immunology Laboratory, Oswaldo Cruz Institute, Rio de Janeiro, Brazil; [Contributor Information](#).

Copyright © 2017 Souza, Azeredo, Badolato-Corrêa, Damasco, Santos, Petitinga-Paiva, Nunes, Barbosa, Cipitelli, Chouin-Carneiro, Faria, Nogueira, de Bruycker-Nogueira, dos Santos, et al

Abstract

Background: Chikungunya virus (CHIKV) is an arbovirus that causes an acute febrile syndrome with a severe and debilitating arthralgia. In Brazil, the Asian and East-Central South African (ECSA) genotypes are circulating in the north and northeast of the country, respectively. In 2015, the first autochthonous cases in Rio de Janeiro, Brazil were reported but until now the circulating strains have not been characterized.

Therefore, we aimed here to perform the molecular characterization and phylogenetic analysis of CHIKV strains circulating in the 2016 outbreak occurred in the municipality of Rio de Janeiro.

Methods: The cases analyzed in this study were collected at a private Hospital, from April 2016 to May 2016, during the chikungunya outbreak in Rio de Janeiro, Brazil. All cases were submitted to the Real Time RT-PCR for CHIKV genome detection and to anti-CHIKV IgM ELISA. Chikungunya infection was laboratorially confirmed by at least one diagnostic method