



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

JÉSSICA BARLETTO DE SOUSA BARROS

**QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-
INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO ZIKA
VÍRUS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE**

Goiânia

2017



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
COORDENAÇÃO DE PÓS-GRADUAÇÃO *STRICTO SENSU*
MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE**

**QUANTIFICAÇÃO DE MOLÉCULAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-
INFLAMATÓRIAS EM INDIVÍDUOS INFECTADOS PELO ZIKA
VÍRUS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE**

JÉSSICA BARLETTO DE SOUSA BARROS

ORIENTADORA: PROFA. DRA. IRMTRAUT ARACI HOFFMANN PFRIMER

CO-ORIENTADORA: SIMONE GONÇALVES DA FONSECA

**Dissertação de Mestrado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação *Stricto
Sensu* em Ciências Ambientais e Saúde,
área de concentração Sociedade e Saúde,
da Pontifícia Universidade Católica de
Goiás, como requisito para a obtenção
do Título de Mestre em Ciências
Ambientais e Saúde.**

Goiânia

2017

S725q

Sousa, Jessica Barletto

Quantificação de moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias em indivíduos infectados pelo Zika Virus na fase aguda e convalescente[manuscrito] / Jessica Barletto Sousa.-- 2017.

69 f.; il. 30 cm

Texto em português com resumo em inglês

Dissertação (mestrado) -- Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Programa de Pós-Graduação Stricto Sensu em Ciências Ambientais e Saúde, Goiânia, 2017

Inclui referências f.57-64

1. Infecção por Zika Virus. 2. Dengue. 3. Proteína C-Reativa. I.Pfimer, Irmtraut Araci Hoffmann. II.Pontifícia Universidade Católica de Goiás. III. Título.

CDU: 616.995.7(043)



DISSERTAÇÃO DO MESTRADO EM CIÊNCIAS AMBIENTAIS E SAÚDE
DEFENDIDA EM 16 DE MARÇO DE 2017 E CONSIDERADA
aprovada PELA BANCA EXAMINADORA:

1) Imtraut Araci Hoffman Pfimer
Profa. Dra. Imtraut Araci Hoffman Pfimer / PUC Goiás (Presidente)

2) Patricia R. C. Nagib Loyola
Profa. Dra. Patricia Resende Alo Nagib Loyola / UFG (Membro Externo)

3) Rodrigues
Prof. Dr. José Rodrigues do Carmo Filho / PUC Goiás (Membro)

4) _____
Profa. Dra. Vera Aparecida Saddi / PUC Goiás (Suplente)

Porque desde a antiguidade não se ouviu, nem com ouvidos se percebeu, nem com os olhos se viu um Deus além de ti que trabalha para aquele que nele espera.

Isaías 64:4

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho especialmente:

À Deus, pois Ele é a força que me sustenta a cada manhã, e seu cuidado e amor me proporcionaram sempre o melhor e me fazem realizar todos os meus sonhos, inclusive esse.

*Ao meu amor, meu grande amor e amado **Joaquim José de Barros Neto** que me inspira e ajuda todos os dias. Meu amor, melhor amigo, exemplo, orgulho e conselheiro, obrigada por ser meu grande companheiro de todos os momentos! Te amo bem grande, você é meu tesouro precioso, meu grande presente!*

*Aos meus maravilhosos pais, **Jorcelino Ferreira de Sousa e Beatriz Tereza Barletto Ferreira de Sousa**, por serem os melhores sempre e meus preciosos presentes. Vocês são minha inspiração e graças a vocês cheguei até aqui e superei todos os obstáculos da vida.*

Amo muito vocês!

*À todos os meus familiares e em especial aos que me acompanharam nessa jornada: **Vovô Garcia, Vovó Grecilda e Claudimira, Maxwell, Samuel, Valdinéia, Rita de Cássia, Maria Angélica, Lino e Lino Filho.***

*A minha companheira de mestrado **Maria Alice**, por tornar esses anos mais especiais. E minha amiga irmã **Rosemary**, por ser um anjo em minha vida, aprendi muito com suas experiências e dedicação.*

AGRADECIMENTOS

À professora **Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer**, pelos ensinamentos, empenho e dedicação, que foram fundamentais na elaboração deste trabalho. Obrigada pela confiança, reconhecimento e investimento.

À professora **Dr^a. Simone Gonçalves da Fonseca** do laboratório de Imunologia do IPTSP/UFG-GO, por desempenhar um papel crucial no desenvolvimento de todas as etapas.

Aos professores que participaram da minha banca de defesa, **Patrícia Resende Alo Nagib Loyola e José Rodrigues do Carmo Filho**, pelas correções, sugestões e discussões que contribuíram para o enriquecimento do trabalho final. Vocês foram essenciais!

À **Pontifícia Universidade Católica de Goiás**, pelo apoio e empenho de todos os funcionários.

À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro por meio de bolsa de mestrado.

À técnica de laboratório **Ana Paula Maia** por seu esmero e preocupação, sua ajuda foi primordial.

Aos queridos amigos do Núcleo de Estudo e Pesquisas Imunológicas (NEPY): **Alexandra, Layena, Luiza, Oximano, Pedro, Rosemary e Thayná**. Vocês foram incríveis e a colaboração de cada um fundamental.

Aos amigos do Instituto de Patologia Tropical e Saúde Pública (IPTESP): **Jacyelle e Paulo**, obrigada pela ajuda no decorrer do trabalho, e a **Fernanda**, pela sua atenção em me ajudar em cada dúvida e obstáculo, principalmente com os gráficos.

RESUMO

BARROS, J.B.S. **Quantificação de moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias em indivíduos infectados pelo Zika vírus na fase aguda e convalescente.** 2017. 69f. Dissertação (Mestrado) – Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC, GO, Goiânia, 2017.

O Zika vírus (ZIKV) é um Flavivírus pertencente à família *Flaviviridae*, que foi inicialmente encontrado e isolado em um macaco Rhesus na floresta Zika, África, em 1947. É responsável por ocasionar a febre Zika, caracterizada principalmente por sintomas como febre, cefaleia, artralgia, mialgia e exantema maculopapular. Atualmente, a infecção pelo ZIKV têm sido considerada uma infecção emergente e endêmica e por isso diversos aspectos clínicos da doença já foram esclarecidos, mas ainda existem características inflamatórias que precisam ser elucidadas. Assim, o presente trabalho objetivou avaliar as citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12p70, IL-15 e IL-17A), anti-inflamatórias (IL- 4, IL-10, IL-13 e IL-1ra), e proteínas de fase aguda (proteína C reativa e ferritina) em infectados pelo ZIKV. Observamos alterações nos níveis da Proteína C Reativa em infectados pelo ZIKV quando comparados aos doadores saudáveis, o mesmo foi verificado na fase aguda e convalescente. Em relação aos níveis de ferritina, esses não apresentaram alterações consideráveis em nenhum momento do estudo. Também foi constatado um aumento da IL-5, IL-7 e IL-9, quando comparado os níveis da fase aguda e grupo controle. Não foram encontradas alterações nos níveis das citocinas IL-4, IL-10 e IL-13, no entanto níveis significativos de IL-1ra foram detectados em infectados pelo ZIKV. Em relação a fase aguda e convalescente, apenas a IL-7 apresentou valores significativamente estatísticos. Todas essas moléculas foram correlacionadas com a quantidade de sinais e sintomas, e nenhuma diferença estatística foi observada.

Palavras-chave: Zika vírus; Inflamação; Citocinas; Proteína C Reativa; Ferritina.

ABSTRACT

BARROS, J.B.S. **Quantification of inflammatory and anti-inflammatory molecules in individuals infected by Zika virus in the acute and convalescent phase. 2017. 69f.** [Masters Dissertation] – Mestrado de Ciências Ambientais e Saúde, Pontifícia Universidade Católica de Goiás – PUC, GO, Goiânia, 2017.

The Zika virus (ZIKV) is a Flavivirus belonging to the family Flaviviridae, which was initially found and isolated on a Rhesus monkey in the Zika forest, Africa, in 1947. It is responsible for causing Zika fever, characterized mainly by symptoms such as fever, headache, Arthralgia, myalgia, and maculopapular rash. Currently, ZIKV infection has been considered an emerging and endemic infection and therefore several clinical aspects of the disease have been clarified, but there are still inflammatory features that need to be elucidated. The aim of the present study was to evaluate the inflammatory cytokines (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12p70, IL-15 and IL-17A), anti-inflammatory (IL-4, IL-10, IL-13 and IL-1ra), and acute phase proteins (C-reactive protein and ferritin) in ZIKV-infected patients. We observed alterations in levels of C-reactive protein in ZIKV-infected patients when compared to healthy donors, and it was verified in the acute and convalescent phase. In relation to ferritin levels, they did not present significant changes at any point in the study. An increase in IL-5, IL-7 and IL-9 was also observed when compared to the acute and control groups. No changes were found in IL-4, IL-10 and IL-13 cytokines, however significant levels of IL-1ra were detected in ZIKV-infected individuals. Regarding the acute and convalescent phase, only IL-7 presented statistically significant values. All these molecules were correlated with the amount of signs and symptoms, and no statistical difference was observed.

Keywords: Zika virus; Inflammation; Cytokines; C-reactive protein; Ferritin.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Ciclo de transmissão do Zika vírus na África.....	14
Figura 2 – Propagação Mundial do Zika Vírus.....	15
Figura 3 – Casos notificados e confirmados de microcefalia em todo território nacional.	16
Figura 4 - Filograma representativo mostrando o relacionamento entre as estirpes do gênero Flavivírus.	17
Figura 5 – Ilustração da partícula viral do ZIKV.....	18
Figura 6 - Organização genômica do ZIKV	19
Figura 7 - Distribuição Global do <i>Ae aegypti</i>	20
Figura 8 – Escala de dias para o diagnóstico laboratorial por PCR em Tempo Real e Sorologia (IgM e IgG) para o ZIKV.....	24
Figura 9 – Fluxograma do estudo.....	31
Figura 10 – Quantificação de Proteína C Reativa em no grupo controle e infectados pelo ZIKV na fase aguda.....	40
Figura 11 - Quantificação de ferritina no grupo controle e infectados pelo ZIKV na fase aguda.....	41
Figura 12 - Quantificação das citocinas inflamatórias IL-5 (A), IL-7 (B), IL-9 (C) em indivíduos infectados com o ZIKV e grupo controle	42
Figura 13 – Quantificação das citocinas inflamatórias IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-6 (C), IL-12p70 (D), IL-15 (E) e IL-17A (F) em indivíduos infectados com o ZIKV e grupo controle.	43
Figura 14 – Quantificação das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) em indivíduos infectados com o ZIKV e grupo controle.....	45
Figura 15 – Quantificação da PCR nos indivíduos infectados pelo ZIKV em diferentes fases, aguda e convalescente.....	46
Figura 16 - Quantificação de ferritina nos indivíduos infectados pelo ZIKV em diferentes fases, aguda e convalescente.	47
Figura 17 - Quantificação de IL-7 de seis indivíduos ZIKV positivos na fase aguda e convalescente.	48
Figura 18 – Correlação dos níveis de IL-5 e número de manifestações clínicas apresentadas pelos infectados pelo ZIKV.....	49

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Preparo da solução de PCR final para detecção do RNA viral do ZIKV.....	34
Quadro 2 – Diluição do calibrador para PCR	35
Quadro 3 – Diluição do calibrador para ferritina.....	35
Tabela 1 – Principais manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos positivos para o ZIKV.....	38
Tabela 2 – Tempo de Coleta das amostras sanguíneas após manifestação clínica, sinais e sintomas.....	39

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

% - Porcentagem

< - menor

≤ - Menor ou Igual

CAAE – Certificado de Apresentação de Apreciação Ética

CHIKV – Vírus Chikungunya

DENV – Vírus da Dengue

DP – Desvio Padrão

EDTA - Ácido Etilenodiamino Tetra-Acético

ELISA – Ensaio imunoenzimático

GBS – Síndrome de Guillain- Barré

IgG – Imunoglobulina G

IgM – Imunoglobulina M

IL- Interleucina

Kb – Kilobase

KDa – Kilodaltons

NEPY – Núcleo de Estudo e Pesquisas Imunológicas

Nm – Nanômetro

p – Probabilidade de significância

PCR – Proteína C Reativa

PCR em Tempo Real/ RT-qPCR – Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real

pg/mL – Picograma por Mililitro

PUC-GO – Pontifícia Universidade Católica de Goiás

RNA – Ácido Ribonucleico

RNAfs+ - RNA Fita Simples Senso Positivo

TRIS-HCL – Cloreto TRIS

WHO – Organização Mundial de Saúde, do inglês, *World Health Organization*

ZIKV – Zika Vírus

ZIKVBR – Cepa Brasileira do Zika Vírus

S.D – Sem data

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	A DESCOBERTA	14
1.3	O VÍRUS	17
1.3.1	Classificação	17
1.3.2	Estrutura do Zika Vírus	18
1.3.3	Linhagens do Zika Vírus	19
1.4.1	Transmissão vetorial	19
1.4.2	Transmissão Sexual	20
1.4.3	Transmissão Congênita	21
1.6	TRATAMENTO	23
1.8	RESPOSTA IMUNITÁRIA	24
1.8.1	Reposta Imune Viral	24
1.8.2	Citocinas Inflamatórias e Anti-Inflamatórias	25
1.8.3	Proteínas de Fase Aguda	27
1.9	JUSTIFICATIVA	29
1.10.1	Objetivo Geral	30
1.10.2	Objetivos Específicos	30
2.	MATERIAIS E MÉTODOS	31
2.1	LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO	31
2.3	AMOSTRAS DE SANGUE	32
2.4	EXTRAÇÃO DE RNA	32
2.5	DETECÇÃO DO RNA VIRAL PARA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO	33
2.8	QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA	34
2.6	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRITINA	35
2.7	QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS	36
2.9	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	37
3	RESULTADOS	38
3.1	CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES DO ESTUDO, ZIKV POSITIVOS E DOADORES SAUDÁVEIS	38
3.3	QUANTIFICAÇÃO DE FERRITINA NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E GRUPO CONTROLE	41
3.4	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-1ra, IL-4, IL-10 e IL-13) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E GRUPO CONTROLE	44
3.5	QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE	46
3.7	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS (IL-1 β , IL-2, IL-5 IL-6, IL-7, IL12p70, IL-15, IL-17A) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE	48
3.8	QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-1ra, IL-4, IL-10 E IL-13) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE	48
3.9	CORRELAÇÃO ENTRE AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-2, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15 E IL-1ra	48
4	DISCUSSÃO	50
6	CONCLUSÃO	56
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	57

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	65
APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO.....	68
ANEXO.....	69

1 INTRODUÇÃO

1.1 A DESCOBERTA

Em 1947, o ZIKV foi descoberto na floresta Zika, localizada nas proximidades da península de Entebbe, capital da República de Uganda (África), por pesquisadores do *Virus Research Institute* durante um estudo para febre amarela em macacos Rhesus. O novo microorganismo identificado foi denominado de Zika vírus, em virtude do nome da floresta Zika (DICK; KITCHEN; HADDOW, 1952).

Estudos filogenéticos do genoma viral indicam que o ZIKV provavelmente surgiu na África por volta de 1920. Desde então, mantém seu ciclo natural na África principalmente entre macacos e espécies silvestres de mosquitos *Aedes* (*Ae. fuscifer*, *Ae. taylori*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. vittatus*, *Ae. pock* e *Ae. africanus*), com ocasionais infecções humanas – (Figura 1) (FREIRE, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2016).

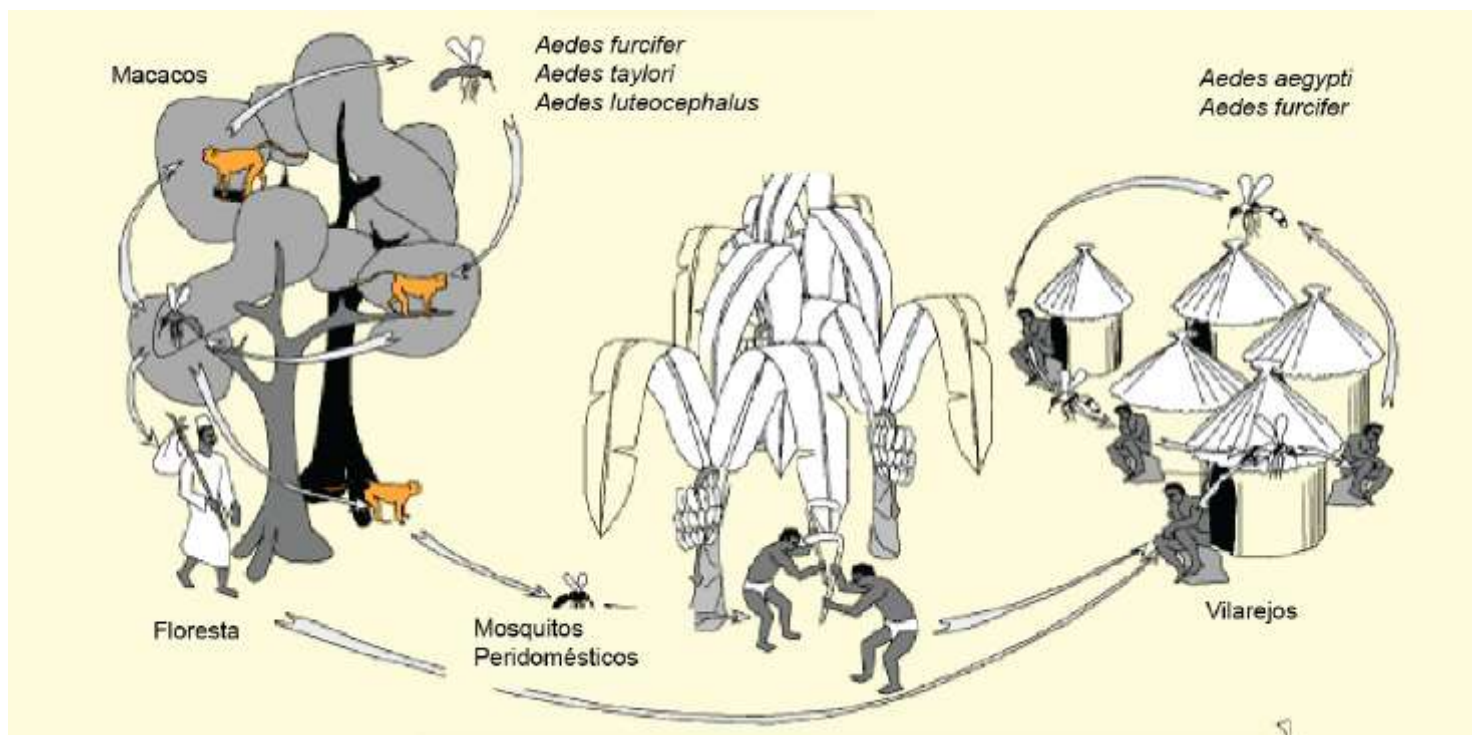


Figura 1 - Ciclo de transmissão do Zika vírus na África. O vírus mantém seu ciclo de transmissão silvestre nas florestas, ocorrendo principalmente entre macacos e mosquitos, com infecções humanas ocasionais. Fonte: Freire, 2014.

Os primeiros casos de infecção em humanos foram relatados em 1952 na Uganda. No ano seguinte alguns casos foram detectados na Nigéria, e em 1956 estudos experimentais constataram infecção transmitida pelo *Aedes aegypti* infectados laboratorialmente (HAYES, 2009; FAYE *et al.*, 2013; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015).

O ZIKV foi descrito como o responsável por infecções esporádicas em humanos por 50 anos, se restringindo apenas à África e Ásia até 2007. Entretanto, nesse ano ocorreu um surto do vírus nas ilhas Yap, Micronésia, com infecção de aproximadamente 75% da população. A partir desse período, o vírus tornou-se emergente (DUFFY *et al.*, 2009; ZANLUCA *et al.*, 2015; AL-QAHTANI *et al.*, 2016).

1.2 CIRCULAÇÃO DO VÍRUS

Entre outubro de 2013 e abril de 2014 inúmeros episódios foram relatados no sudeste do Pacífico, com um surto de aproximadamente 19.000 casos na Polinésia Francesa e ilhas da região (SLAVOV *et al.*, 2016). Em seu estudo Kucharski *et al.* (2016) constataram que aproximadamente 94% da população da Polinésia Francesa foi infectada durante a epidemia, e foram relatados 42 casos de síndrome de *Guillain-Barré* (GBS).

Desde então, o ZIKV rapidamente se espalhou por 65 países e territórios da África, Ásia, Pacífico e Américas (DENG *et al.*, 2016; WHO, 2016a). A **Figura 2** mostra a dispersão do ZIKV pelo mundo.

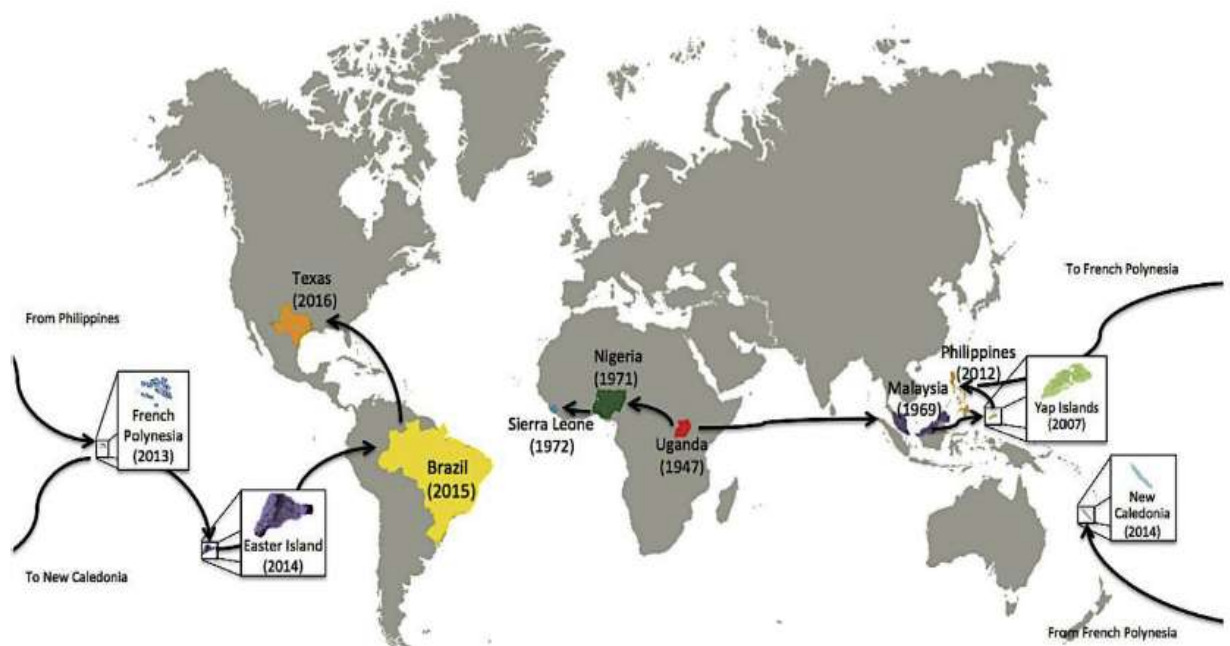


Figura 2 - Propagação Mundial do Zika Vírus. Fonte: Chang *et al.*, 2016.

Em 2014, o vírus se disseminou na América do Sul, e em maio de 2015 foram confirmados os primeiros casos de autoctonia do ZIKV no nordeste brasileiro (FANTINATO *et al.*, 2016; SVS – MS, 2016a). A partir de então, uma rápida disseminação do vírus foi registrada em todo território nacional e por isso a WHO estabeleceu o surto como um problema de saúde pública internacional (WHO, 2016b). Até a 50ª semana de 2016 foram notificados 214.193 casos prováveis de febre pelo vírus Zika no país, sendo 33.848 registrados na região Centro-Oeste e 9.857 no estado de Goiás (SVS – MS, 2016b).

O grande problema concernente à infecção pelo ZIKV no Brasil foi o aumento dos casos de microcefalia. No período de 2010 a 2014, foram registrados no Brasil uma média anual de 156 casos de microcefalia. Entretanto, no ano de 2015, até o dia 1º de dezembro, foram notificados 1.247 casos de recém-nascidos com essa malformação (VARGAS *et al.*, 2016). De acordo com o Boletim Epidemiológico do COES - Microcefalias (2016), foram notificados 10.441 casos suspeitos de microcefalia relacionados ao ZIKV no Brasil até a 55ª semana de 2016 (**Figura 3**). Desses, 3.173 foram investigados, 2.228 confirmados para microcefalia e/ou alteração do sistema nervoso central sugestivos de infecção congênita relacionada ao ZIKV e 5.040 foram descartados. No estado de Goiás foram registrados 227 casos suspeitos de infecção congênita pelo ZIKV, 65 continuam em investigação, 44 foram confirmados e 118 descartados.

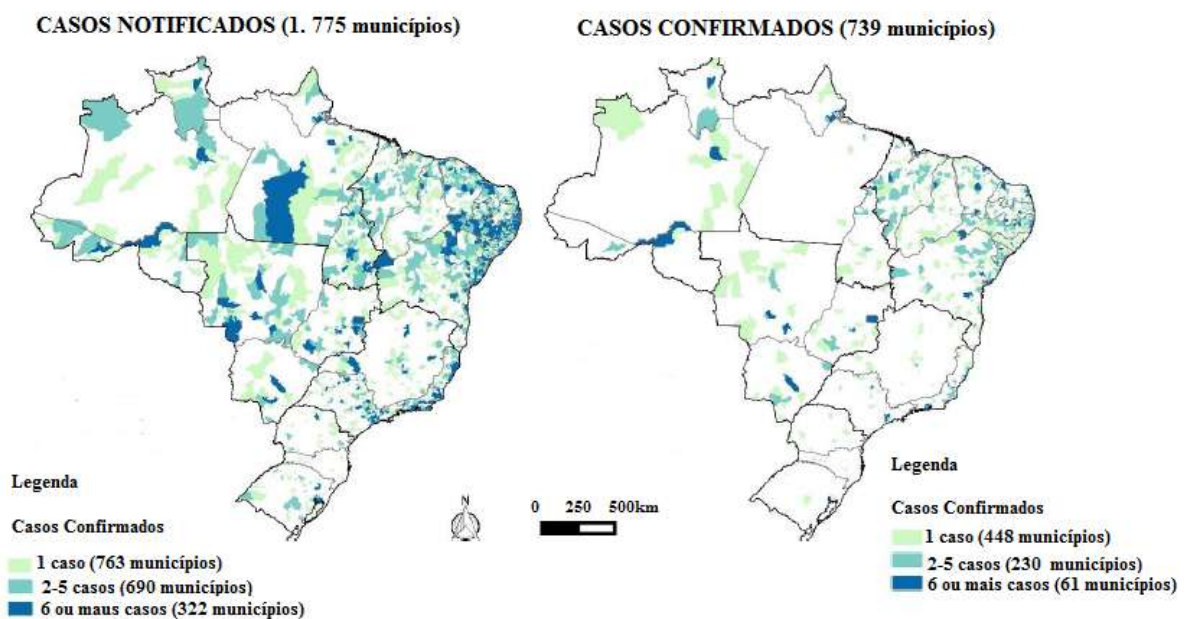


Figura 3 – Casos notificados e confirmados de microcefalia em todo território nacional. Fonte: Adaptado de COES- Microcefalias, 2016.

1.3 O VÍRUS

1.3.1 Classificação

O ZIKV pertence ao gênero *Flavivírus* e a família *Flaviviridae*, sendo por isso correlacionado com outras flaviviroses como febre amarela, dengue, febre do oeste do Nilo e encefalite japonesa (**Figura 4**) (HAYES, 2009; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015). Além dessas, existem mais de 50 espécies virais incluídas na família *Flaviviridae*, todas estão relacionadas a infecções brandas que envolvem um quadro febril, podendo ocasionar em última instância manifestações clínicas severas, como hemorragias e encefalites (BLÁSQUEZ *et al.*, 2014).

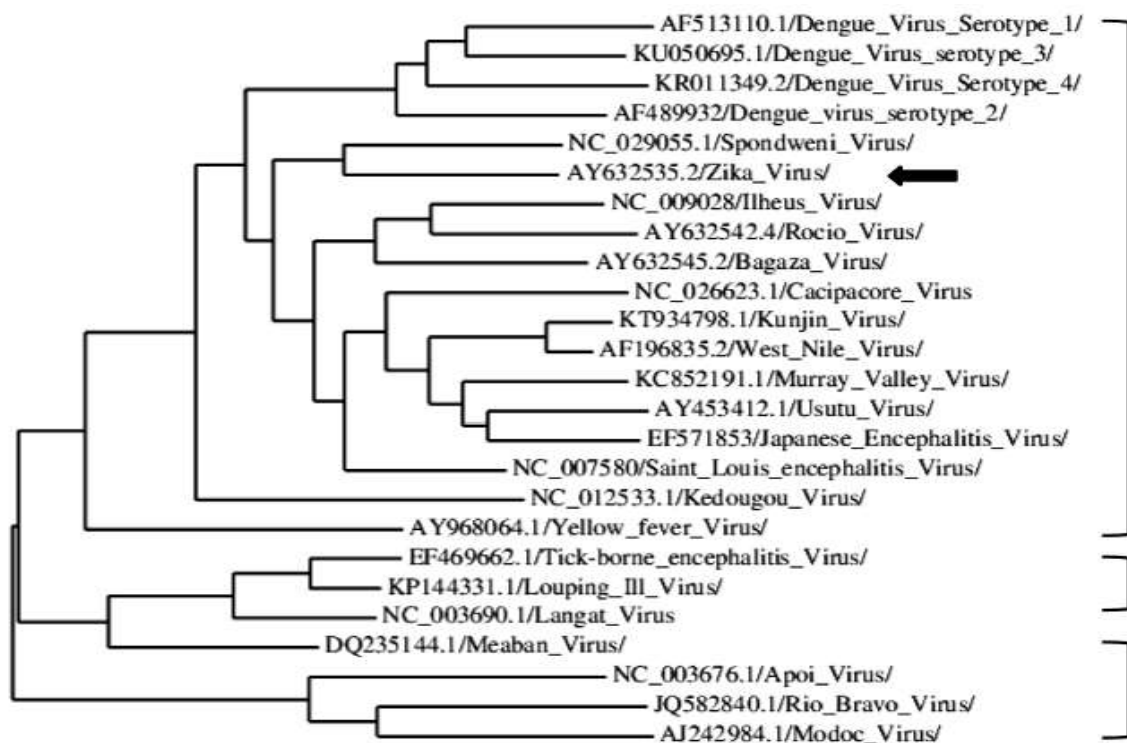


Figura 4 - Filograma representativo mostrando o relacionamento entre as estirpes do gênero *Flavivírus*. Os números de acesso do sequenciamento são mostrados na árvore. A árvore foi construída com base na sequência completa dos nucleotídeos NS5 do genoma viral. A seta está indicando a posição do ZIKV. Fonte: Adaptado de Saiz *et al.*, 2016.

Os *Flavivírus* pertencem a um grupo de vírus denominado de arbovírus. O termo arbovírus origina-se da expressão inglesa “*arthropod-borne virus*”, no qual estão incluídos centenas de vírus constituídos de um genoma composto de ácido ribonucleico (RNA) e que são transmitidos por meio de vetores artrópodes, como mosquitos e carrapatos (CRUZ; VASCONCELOS, 2008; CHANG *et al.*, 2016). Além disso, a família *Flaviviridae* pertence ao grupo IV da classificação de Baltimore, em que o material genético viral é formado por

apenas uma única fita de RNA senso positivo, que é similar ao RNA mensageiro humano e por isso facilmente transcrito e traduzido pelos ribossomos em proteínas virais, que serão utilizadas para a montagem de novos vírus (BALTIMORE, 1971). Ademais, o ZIKV é membro do sorocomplexo Spondweni por apresentar maior semelhança com o vírus Spondweni (FAYE *et al.*, 2014).

1.3.2 Estrutura do Zika Vírus

O ZIKV é uma partícula esférica de aproximadamente 42nm a 52 nm, constituído por um RNA senso positivo de aproximadamente 10,8 kb que apresenta terminações não codificantes, 5' e 3', e outras regiões codificantes de proteínas responsáveis pelas funções e arquitetura viral, sendo codificadas em um complexo poliproteico composto pelos seguintes componentes: capsídeo (C), membrana (M), pré-membrana (P), proteína do envelope (E) e sete proteínas não-estruturais (NS) denominadas de: NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 (**Figura 5 e 6**). Essas proteínas não-estruturais possuem atividade enzimática (NS3: helicase e protease de RNA e NS5: polimerase de RNA) ou regulatória, atuando sob a resposta imunitária, replicação, transcrição e tradução durante os processos intracelulares da replicação viral (FAYE *et al.*, 2013; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015, CHANG *et al.*, 2016; MLAKAR *et al.*, 2016; YE *et al.*, 2016).

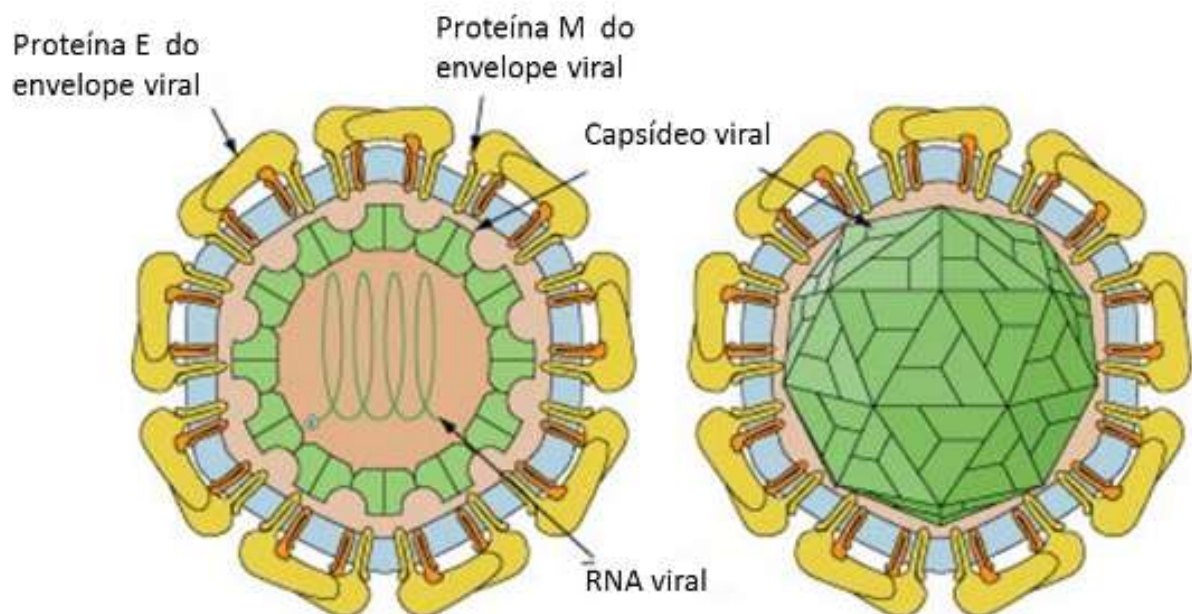


Figura 5 – Ilustração da partícula viral do ZIKV. Fonte: Viral Zone, Swiss Institute of Bioinformatics, 2011.

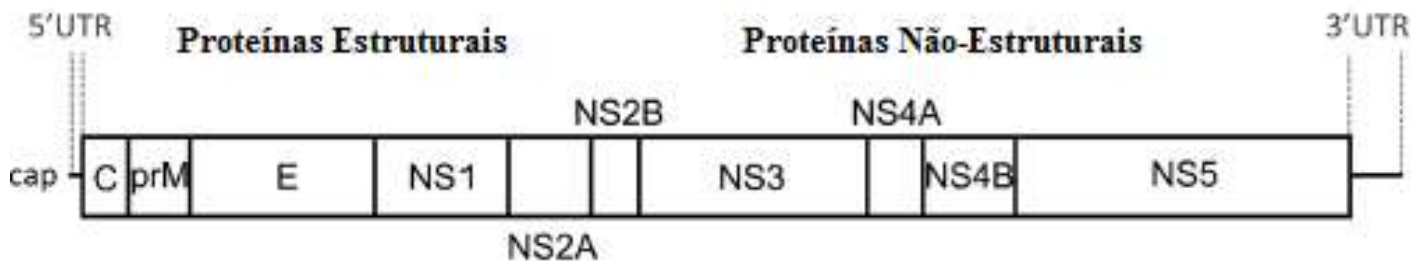


Figura 6 - Organização genômica do ZIKV. Barra da escala 1kb. Fonte: Adaptado de Saiz *et al.*, 2016.

1.3.3 Linhagens do Zika Vírus

Existem duas linhagens do ZIKV no mundo, africana e asiática, que foram distinguidas pela sequência genômica de RNA e por regiões homólogas da proteína NS5 (BALM *et al.*, 2012; CHANG *et al.*, 2016). A linhagem africana ainda é dividida em dois grupos: leste (que contém as variações genéticas do protótipo MR766 isolado em 1947) e oeste africana, que surgiu após duas fases de migração do vírus para essa região (PINTO JUNIOR *et al.*, 2015; SAIZ *et al.*, 2016).

Estudos filogenéticos do genoma viral indicam que a linhagem africana é a responsável pelos surtos que ocorreram na África e que as epidemias registradas na Micronésia, Polinésia Francesa e Brasil foram ocasionados pela linhagem asiática. Um estudo molecular filogenético do genoma viral indicou que o vírus circulante no Brasil tem como ancestral comum o vírus que circulou na Polinésia Francesa em 2013, e que esse provavelmente chegou ao Brasil na Copa das Confederações do mesmo ano (BARONTI *et al.*, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2016; FARIA *et al.*, 2016).

1.4 TRANSMISSÃO

1.4.1 Transmissão vetorial

Assim como outros Flavivírus, o ZIKV é transmitido primariamente por mosquitos do gênero *Aedes* (*Stegomyia*). Esses são distribuídos globalmente e são habitantes nativos de regiões tropicais e subtropicais (**Figura 7**) (PLOURDE; BLOCH, 2016).

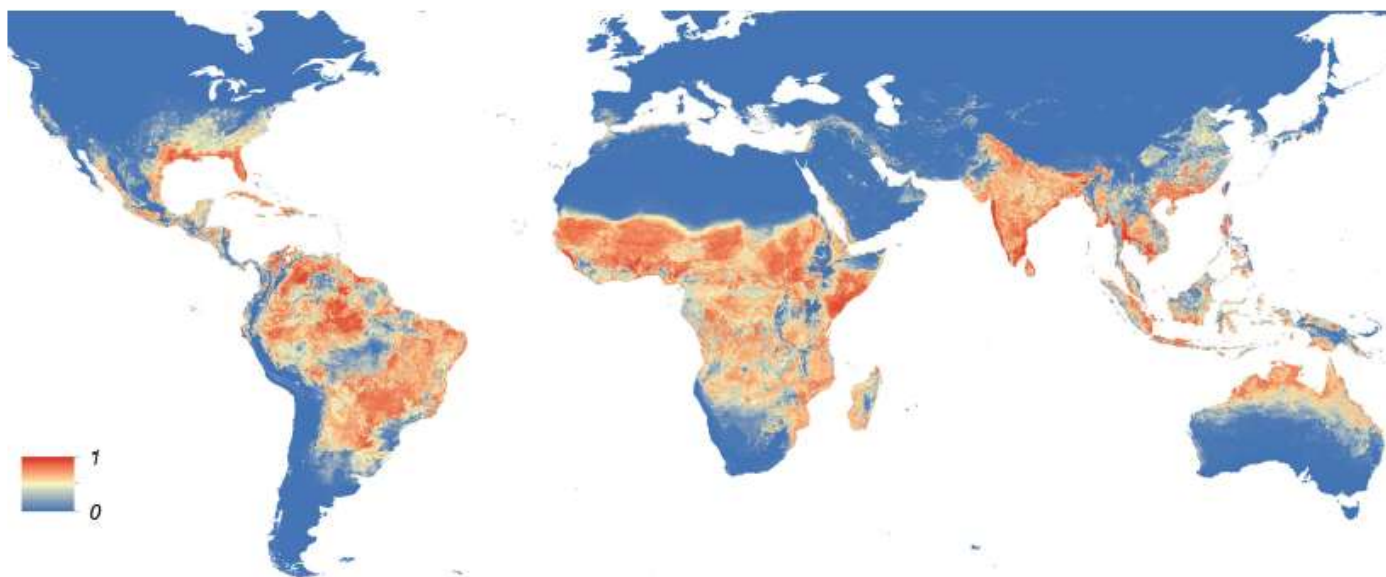


Figura 7 - Distribuição Global do *Ae aegypti*. Fonte: Kraemer *et al.*, 2015.

Diversos tipos de *Aedes* foram relacionados a esse vírus, como: *Ae aegypti*, *Ae. africanus*, *Ae. luteocephalus*, *Ae. hensilli*, *Ae. polynesiensis* e *Ae. albopictus*. O *Ae. aegypti* é o vetor mais abundante na Ásia e Américas, o *Ae. hensilli* foi o principal responsável pelo surto nas ilhas Yap, o principal vetor da África não foi definitivamente identificado e o *Ae. polynesiensis* provavelmente foi o vetor responsável pela disseminação do ZIKV na Polinésia Francesa (CUNHA *et al.*, 2016; PLOURDE; BLOCH, 2016; VALLE, PIMENTA; AGUIAR, 2016).

No Brasil, os principais tipos de *Aedes* (*Stegomyia*) transmissores do ZIKV são o *Aedes* (*Stegomyia*) *aegypti* e *Aedes* (*Stegomyia*) *albopictus* (MARCONDES; XIMENES, 2016). O intervalo de tempo necessário para que uma fêmea adulta do mosquito se torne infectante após o repasto em indivíduo infectado é de 10 dias, esse é denominado de período de incubação extrínseco (PIE) do ZIKV no mosquito (VALLE, PIMENTA, AGUIAR, 2016).

1.4.2 Transmissão Sexual

A transmissão sexual do ZIKV foi descrita entre homem-homem e homem-mulher, e o material genético viral foi detectado no sêmen de indivíduos do sexo masculino até 62 dias após o início da manifestação febril (DECKARD *et al.*, 2016; ATKINSON *et al.*, 2016).

A transmissão sexual do ZIKV foi pontualmente fundamentada em casos ocorridos no Colorado, Texas e Taiti (FOY *et al.*, 2011; MUSSO *et al.*, 2015b; MCCARTHY, 2016).

O primeiro caso ocorreu em 2008, onde um americano adquiriu a infecção pelo ZIKV em Senegal e ao retornar para o Colorado, EUA, teve relações sexuais com sua esposa, que posteriormente também apresentou manifestações da doença. O homem infectado apresentou hematospermia e os resultados do isolamento viral de ambos os pacientes indicaram infecção pelo ZIKV. A transmissão sexual foi então relatada e confirmada, uma vez que a esposa infectada nunca viajou para África e Ásia e não deixou os EUA desde 2007. Além disso, o clima e a fauna de mosquitos do Colorado não forneciam as circunstâncias necessárias para a transmissão vetorial e mesmo que tivesse, não houve o tempo necessário para o PIE do ZIKV no mosquito (FOY *et al.*, 2011).

Outro relato de transmissão sexual ocorreu no Texas, em que um americano se infectou com o ZIKV após contato sexual com um indivíduo que adquiriu a infecção na Venezuela, onde o vírus era circulante. Ambos os indivíduos obtiveram achados clínicos e laboratoriais condizentes com a infecção pelo ZIKV (MCCARTHY, 2016).

Em seu estudo Musso *et al.* (2015b) 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 sugere a replicação do vírus no trato genital masculino.

Além desses relatos de caso, um estudo em macacos Rhesus detectou a presença do ZIKV em fluidos vaginais após a inoculação do vírus por via subcutânea (DUDLEY, 2016) e Prisant *et al.* (2016) encontrou o RNA do ZIKV por PCR em Tempo Real no muco cervical de uma mulher infectada após três dias de manifestações clínicas da doença.

1.4.3 Transmissão Congênita

Desde a introdução do ZIKV ao Brasil, os casos de microcefalia cresceram aproximadamente 20 vezes, sugerindo a hipótese de transmissão congênita. Essa correlação foi assertida por diversos estudos, e dentre esses se destaca a detecção do vírus no líquido amniótico de duas mulheres que desenvolveram a infecção na gravidez. Os exames demonstraram que ambos os fetos apresentavam microcefalia, comprovando a capacidade do vírus de ultrapassar a barreira placentária, atingir o líquido amniótico e infectar o feto (CALVET *et al.*, 2016).

Mlakar *et al.* (2016) descreveram um relato de caso de uma gestante com histórico de infecção pelo ZIKV durante sua estadia no Brasil. Com 29 semanas de gestação uma ultrassonografia revelou que o feto apresentava microcefalia e calcificações cerebrais. O feto foi abortado cirurgicamente e legalmente em seu país de origem, sendo detectada a presença do ZIKV no tecido cerebral fetal, mas não foi encontrado em qualquer outro órgão ou tecido, comprovando o forte tropismo viral pelas células cerebrais.

Fêmeas de camundongos grávidas foram infectadas com a cepa brasileira de ZIKV (ZIKVBR), o estudo evidenciou que os filhotes das grávidas que apresentaram a infecção possuíam um claro indício de atraso no desenvolvimento de todo o corpo, e um ensaio de qPCR demonstrou a presença de RNA viral em vários tecidos desses recém-nascidos, com prevalência significativa no cérebro, confirmando o neurotropismo viral e agressividade da cepa brasileira. Além disso, os resultados indicam que o ZIKVBR é capaz de atingir as células progenitoras corticais, induzindo a morte celular por apoptose e autofagia (CUGOLA *et al.*, 2016). O ZIKV é capaz de infectar células progenitoras do córtex neural, ocasionando problemas transcricionais e um retardo no crescimento celular (TANG *et al.*, 2016).

1.5 SINTOMAS

A grande maioria das infecções são assintomáticas (80%), e quando o ZIKV proporciona a febre Zika, essa geralmente é leve e auto-limitada, com período de incubação de aproximadamente 10 dias e duração dos sintomas de 2-7 dias (KUTSUNA *et al.*, 20014; WHO, 2016c; OSTER *et al.*, 2016 TAPPE *et al.*, 2015). A sintomatologia da infecção não é específica, podendo ser confundida com quadros ocasionados por outros Flavivírus, como DENV e CHIKV (ZALUNCA *et al.*, 2016).

Os sintomas incluem febre baixa e somente em casos raros elevada, 39°C, que surge de início agudo e vem acompanhada de uma ligeira cefaleia. Além disso, são descritos episódios de exantema maculopapular pruriginoso, que aparece comumente no segundo dia e se distribui pela face, tronco, palmas das mãos e planta dos pés. A febre desaparece um ou dois dias após o surgimento do exantema e pode persistir por cerca de 2-14 dias (PINTO JUNIOR *et al.*, 2015). Em contraste com a dengue, os sintomas de mal-estar e cefaleia são mais brandos e complicações hemorrágicas e de choque não foram relatadas (TAPPE *et al.*, 2015).

Ainda são relatadas dores articulares e musculares, acompanhadas ou não de edema, que tem duração média de 3-5 dias e desaparecem após uma semana. Distinguem-se das dores

ocasionadas pelo CHIKV pela menor intensidade de manifestação e pelas áreas afetadas. O ZIKV também proporciona complicações oftalmológicas, como conjuntivite, não purulenta, capaz de gerar fotofobia. Outras manifestações inespecíficas também podem acontecer como orbitalgia, anorexia, dor abdominal, diarreia, náuseas, vômitos, vertigem (PINTO JUNIOR *et al.*, 2015; CAVEIÃO *et al.*, 2016).

Ademais, apesar de ser uma infecção de origem benigna, algumas complicações podem ocorrer como a GBS, microcefalia, problemas neurológicos e oculares em recém-nascidos. A GBS é uma neuropatia inflamatória auto-imune que proporciona um quadro de fraqueza muscular, tetraparesia nos membros inferiores, parestesia das extremidades, mialgia difusa e paralisia facial assimétrica (TELERRIA-DIAZ; CALZADA-SIERRA, 2002; OEHLER *et al.*, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015; PETERSEN *et al.*, 2016). A WHO/CDC/ICBDSR (2014) considera caso de microcefalia quando o perímetro cefálico é menor que dois ou mais desvios-padrão do que o indicado para o sexo, idade ou período de gestação.

1.6 TRATAMENTO

O tratamento sintomático da doença é feito com repouso, hidratação, não sendo indicados anti-inflamatórios não hormonais. As complicações como a síndrome de GBS devem ser tratadas imediatamente em ambiente hospitalar, e em alguns casos é indicado o uso de imunoglobulina (HAYES *et al.*, 2009; FOY *et al.*, 2011).

1.7 DIAGNÓSTICO

A base diagnóstica para o ZIKV consiste na detecção do ácido nucleico viral por Reação da Cadeia da Polimerase em Tempo Real (PCR em Tempo Real), que fundamenta-se na transcrição reversa do genoma viral acompanhada da reação em cadeia da polimerase em tempo real. A detecção do material genético viral determina um diagnóstico definitivo, no entanto existe uma grande dificuldade em fazê-lo porque a viremia do Zika é geralmente baixa, e o diagnóstico é mais bem sucedido nos primeiros dias de infecção (**Figura 8**) (PETERSEN *et al.*, 2016).

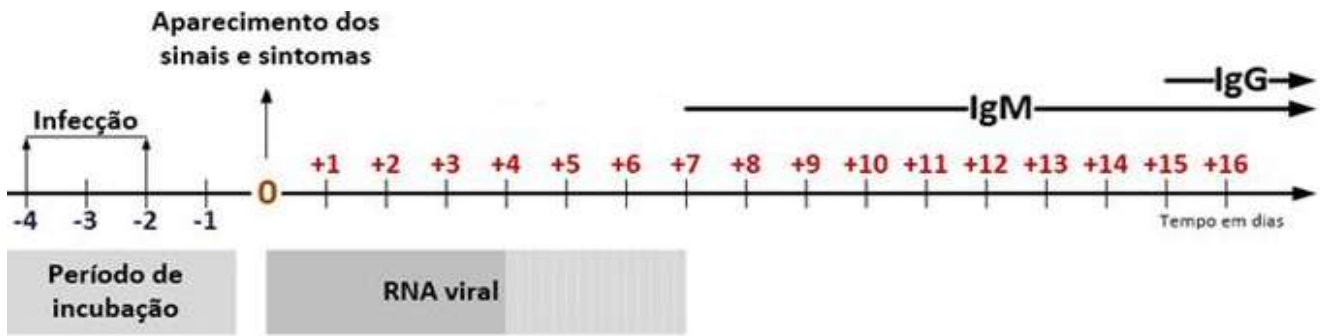


Figura 8 – Escala de dias para o diagnóstico laboratorial por PCR em Tempo Real e Sorologia (IgM e IgG) para o ZIKV. Fonte: Adaptado de Cunha *et al.*, 2016.

Além da PCR em Tempo Real, existe o diagnóstico laboratorial pela detecção de anticorpos IgM e IgG por Ensaio Imunoenzimático - Elisa. Entretanto, foi observada uma grande reatividade cruzada com outras flavoviroses, especialmente dengue, e por isso essa metodologia deve ser cautelosamente avaliada (DEJNIRATTISAI *et al.*, 2016; NUNES *et al.*, 2016; PETERSON *et al.*, 2016b).

1.8 RESPOSTA IMUNITÁRIA

1.8.1 Resposta Imune Viral

As respostas imunes virais são iniciadas por meio da resposta imune inata, a partir da ação de interferons tipo I (IFN- α e IFN- β), macrófagos e células NK. Os interferons tipo I são sintetizados por células infectadas por vírus, e fornecem proteção as células não infectadas. Macrófagos e outras células apresentadoras de antígenos produzem IL-12, capaz de estimular citotoxicidade por células NK, as quais liberam granzimas e perforinas para destruir as células infectadas. Além disso, as células NK produzem IFN- γ , que aumenta o potencial microbicida dos macrófagos. Na imunidade adaptativa, as células TCD8⁺ reconhecem as células infectadas via MHC de classe I, e exercem citotoxicidade celular por meio da liberação de granzimas e perforinas. Ainda nessa resposta, ocorre a ativação de células TCD4⁺, que colaboram para a produção de anticorpos pelas células B, que atuam nos vírus extracelulares por meio de neutralização e podem ser adjuvantes no processo de citotoxicidade celular dependente de anticorpos pela atuação das células NK (MACHADO *et al.*, 2004).

Em relação ao ZIKV, alguns estudos apontam que o ZIKV evade a resposta imune inata de interferons tipo I, sugerindo um papel crucial da resposta imune adaptativa por células TCD8⁺ (WINKLER *et al.*, 2017).

1.8.2 Citocinas Inflamatórias e Anti-Inflamatórias

As citocinas são glicoproteínas ou polipeptídeos extracelulares, com tamanho entre 8-30kDa, responsáveis por mediar a comunicação entre as células do sistema imune por meio de sinais estimulatórios, modulatórios ou inibitórios (VARELLA; FORTE, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2011).

Diferentes células podem produzir a mesma citocina e uma única citocina pode atuar em diversos tipos celulares, fenômeno caracterizado como pleiotropia. Diversamente aos hormônios, as citocinas não são pré-armazenadas e atuam principalmente por forma parácrina (em células vizinhas) e autócrina (na própria célula produtora) (ZHANG; JIANXIONG, 2007; OLIVEIRA *et al.*, 2011). Essas podem ser classificadas de acordo com suas ações indutoras e inibidoras da inflamação em: pró-inflamatórias (Th1, Th9 e Th17) e anti-inflamatórias (Th2), respectivamente (KOPF *et al.*, 1993; SOUZA *et al.*, s.d). O equilíbrio entre essas duas classes de citocinas é o fundamento para a regulação e homeostasia do sistema imune (KIDD, 2003).

O único estudo relacionando diretamente citocinas e a infecção pelo ZIKV em uma coorte, Tappe *et al.* (2015), demonstrou aumento significativo da IL-1 β , IL-2, IL-4, IL-6, IL-9, IL-10, IL-13 e IL-17 na fase aguda da doença, quando os resultados foram relacionados ao grupo controle. Quando avaliado os níveis desses polipeptídeos em diferentes fases da infecção, aguda e convalescente, observou-se um aumento de IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10 e IL-13. Ao se comparar os valores encontrados pelos infectados pelo ZIKV e indivíduos saudáveis, e níveis da fase aguda e convalescente, nenhuma diferença significativa foi observada nesse estudo para IL-1ra, IL-5, IL-7 e IL-12.

Diversas patologias e estados fisiopatológicos podem propiciar a produção de diferentes citocinas e proteínas de fase aguda (MACIEL, 2015). Sinais e sintomas como febre, sono, dor e mialgia, podem ser induzidos por citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2 e IL-6) e anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) conforme a expressão de seus níveis plasmáticos (WALLACE *et al.*, 2001; WALLACE, 2006; MACEDO *et al.*, 2007; HERNANDEZ *et al.*, 2010).

Mediadores inflamatórios tem sido estudados na fisiopatologia da dor de cabeça e foi constatado o aumento de IL-1 β , IL-4, IL-5 e IL-10 em indivíduos com episódios de enxaqueca (DUARTE *et al.*, 2015; BOCKOWSKI *et al.*, 2010).

Em doenças exantemáticas, como na parvovirose e dengue, observou-se a associação positiva entre febre e níveis aumentados de IL-1 β e IL-1ra. A IL-1 β induz o processo febril e

o IL-1ra atua neutralizando as concentrações de IL-1 β (OLIVEIRA PINTO *et al.*, 2012). Além disso, a IL-1 β foi relacionada com a presença de febre, alterações hemodinâmicas, mal-estar, anorexia, artralgia e cefaleia em indivíduos com sepse (GARCIA; ISSY; SAKATA, 2002).

Na febre chikungunya, taxas maiores de vírus foram correlacionadas a níveis de IL-6 na fase aguda da infecção, sendo esses associados com a artralgia persistente (CHOW *et al.*, 2011). O aumento de IL-6 também foi descrito na dengue, sendo responsável por ocasionar a febre e mal-estar dos pacientes (DAHER *et al.*, 2005). Além disso, a IL-6 foi detectada no líquido sinovial durante infecções virais do sistema nervoso central e na artrite inflamatória, sugerindo a síntese de IL-6 por astróglia, micróglia e sinoviócitos durante a inflamação local (GARCIA; ISSY; SAKATA, 2002; VERRI, 2006).

Um estudo de caso de um paciente infectado com o ZIKV e encefalomielite demonstrou o aumento de IL-6 no líquido cefalorraquidiano. Essa citocina foi associada a ativação de células microgliais, danos neuronais e perturbação da barreira hemato-encefálica (GALLIEZ *et al.*, 2016). A infecção do sistema nervoso central pelo vírus da encefalite japonesa foi ocasionada pela produção de IL-4 (WINTER *et al.*, 2004).

Febre, dor de cabeça, calafrios, mialgia e sintomas e sinais semelhantes aos da gripe foram relacionados a IL-10, e manifestações como febre, calafrios, fadiga, náuseas, vômito e cefaleia se associaram a presença de IL-12 (KIM *et al.*, 2003).

O aumento da expressão da IL-15 foi observada no líquido sinovial de pacientes com artrite reumatóide e evidências sugerem a participação da IL-1 β e IL-12 na patogênese dessa doença. Nesse contexto, a IL-1ra atua como uma citocina anti-inflamatória e sua importância foi demonstrada em camundongos com deficiência desse receptor, uma vez que desenvolveram uma inflamação sinovial crônica (SCHMITZ *et al.*, 2005). Além disso, a ação protetora de IL-1ra foi constatada em indivíduos com artrite reumatóide (CUTOLO, 2004).

Além disso, um estudo *in vitro* com a estirpe de sorotipo 2 da dengue constatou em casos severos de infecção a associação da IL-17A com a presença de lesão tecidual (GUABIRABA *et al.*, 2013).

1.8.3 Proteínas de Fase Aguda

As proteínas de fase aguda são proteínas plasmáticas sintetizadas pelo fígado, e se encontram em níveis aumentados mediante infecção e processos inflamatórios. Essas podem atuar de acordo com a gravidade do processo patológico e podem induzir a fagocitose e migração de leucócitos para o local da inflamação (GUIBARRA ESCOBAR; LLIULLI MORANTE, 2011).

1.8.3.1 Proteína C Reativa

A proteína C reativa (PCR) é um dos marcadores mais sensíveis utilizados na inflamação. É produzida pelo fígado, possui peso molecular de 115 KD e é constituída de 5 cadeias polipeptídicas idênticas. Pode ser considerada uma opsonina, por se ligar aos patógenos e iniciar sua eliminação pela ativação do sistema complemento e fagócitos, C1q e Fc γ . Além disso, também está relacionada a extensão e intensidade inflamatória (MACIEL, 2015).

A PCR é um elemento normal do soro humano e em indivíduos saudáveis apresenta concentrações inferiores a 6 mg/L. Entretanto, em condições inflamatórias pode aumentar cerca de 25%, apresentando início da secreção de 4 à 6 horas após o estímulo, duplicando a cada 8 horas, com um pico entre 36 e 50 horas (AGUIAR *et al.*, 2013; MACIEL, 2015). Possui meia vida curta (5-7 horas) e por isso é considerada uma prova de fase aguda ideal, sendo útil no acompanhamento de processos agudos inflamatórios. É predominantemente regulada pelas citocinas IL-6, TNF- α e IL-1 (VOLP *et al.*, 2008).

Esse marcador geralmente apresenta-se elevado em infecções de etiologia bacteriana. No entanto, os valores de PCR já foram constatados em infecções virais, como na infecção respiratória por adenovírus (COSTA *et al.*, 2009). Aguiar *et al.* (2013) menciona um aumento da secreção de PCR, na faixa de 10-40 mg/L, em infecções virais.

1.8.2.2 Ferritina

A ferritina é a principal responsável pelo armazenamento de ferro no organismo. É uma macromolécula (massa molecular de aproximadamente 450 kDa) encontrada em todas as células, principalmente nos hepatócitos, visto que estão relacionados a síntese e metabolismo do ferro. Grandes quantidades de ferritina são encontradas no meio intracelular e apenas

quantidades diminutas em meio extracelular (ARAÚJO, MOURA, MARIANO, 2014; MACIEL, 2015).

Além de ser um excelente marcador das reservas desse metal no organismo, é também considerado uma proteína de fase aguda, que pode apresentar aumento em condições inflamatórias como infecções, traumatismos e inflamações agudas. Nesse contexto, seu aumento acontece nas 24 e 48 horas iniciais ao estímulo, com pico no terceiro dia e permanência da elevação por algumas semanas (THEIL, 2003; LIU *et al.*, 2006; SALDANHA, 2009; GROTTTO, 2010; MACIEL, 2015).

Em quadros inflamatórios, macrófagos e monócitos participam da síntese de ferritina e durante a fase aguda da inflamação, citocinas pró-inflamatórias como IL-1 β , IL-6 e TNF- α estimulam sua produção (KALANTAR-ZADEH *et al.*, 2006; GROTTTO, 2010; WEG *et al.*, 2014). Assim, em complicações inflamatórias apresenta níveis elevados, o que justifica sua importância clínica nessas condições (CHAIYARATANA *et al.*, 2008; LAKS, 2010).

1.9 JUSTIFICATIVA

Atualmente, a infecção pelo ZIKV têm sido considerada uma doença emergente e endêmica, devido ao aumento crescente de casos notificados em diversos países e territórios. De acordo com a World Health Organization (WHO, 2016a), sessenta e cinco países relataram evidências de infecção pelo vírus desde 2007.

Com essa expansão mundial, diversas características clínicas da doença já foram bastante elucidadas, no entanto ainda existem aspectos da parte imuno inflamatória da infecção que precisam ser esclarecidos. Deste modo, escolhemos avaliar as citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12p70, IL-15 e IL-17A), anti-inflamatórias (IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra), e proteínas de fase aguda (proteína C reativa e ferritina) em infectados pelo ZIKV.

As citocinas já têm sido amplamente estudadas em diversas patologias por atuarem na comunicação entre as células do sistema imunitário e assim modularem a resposta inflamatória ante à vigência de antígenos (VARELLA; FORTE, 2001). Da mesma forma, as proteínas de fase aguda estão sendo vastamente empregadas para o acompanhamento de condições inflamatórias (MACIEL, 2015).

Sabe-se que diferentes estados fisiopatológicos podem ocasionar a síntese de diferentes padrões de citocinas e de proteínas de fase aguda (MACIEL, 2015). Assim, o reconhecimento do padrão imunitário na infecção pelo ZIKV pode ser útil na avaliação da extensão da atividade inflamatória, monitorização do curso da doença, entendimento da patogênese da infecção, bem como permite o desenvolvimento de auxílio diagnóstico e delineamento de intervenções terapêuticas.

1.10 OBJETIVO

1.10.1 Objetivo Geral

Avaliar o perfil de moléculas inflamatórias e anti-inflamatórias de indivíduos infectados pelo ZIKV nas fases aguda e convalescente.

1.10.2 Objetivos Específicos

- Descrever características clínicas, epidemiológicas e demográficas dos sujeitos do estudo;
- Detectar o RNA do ZIKV no plasma dos sujeitos da pesquisa;
- Quantificar os níveis de proteína C reativa e ferritina nos indivíduos positivos para o ZIKV nas fases aguda e convalescente da infecção;
- Quantificar os níveis das citocinas inflamatórias (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL12p70, IL-15, IL-17A) nos indivíduos positivos para o ZIKV nas fases aguda e convalescente da infecção;
- Quantificar os níveis das citocinas anti-inflamatórias (IL-4, IL-10 e IL-13) e do receptor IL-1ra nos indivíduos positivos para o ZIKV, nas fases aguda e convalescente da infecção;
- Correlacionar os níveis das citocinas com o número de manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos ZIKV positivos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 LOCAL E POPULAÇÃO DE ESTUDO

O local de estudo foi o município de Goiânia. Esse apresenta clima semi-tropical úmido, que é propício para a proliferação do mosquito *Aedes aegypti*, principal vetor do ZIKV no Brasil (SILVA, MARIANO, SCOPEL, 2007; SILVA JÚNIOR *et al.*, 2011; CUNHA *et al.*, 2016).

Foram incluídos na pesquisa indivíduos com idade ≥ 18 anos e que apresentaram quadro clínico sintomatológico do ZIKV, e excluídos os que apresentavam comorbidades capazes de propiciar alterações na expressão das citocinas e proteínas de fase aguda pesquisadas.

Assim, a população de estudo foi constituída de 176 indivíduos com suspeita de infecção pelo ZIKV, entre fevereiro e março de 2016. As amostras foram coletadas no Núcleo de Estudo e Pesquisas Imunológicas (NEPY), localizado na área V da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, Goiás. Todas as amostras foram analisadas para o ZIKV por PCR em Tempo Real (RT-qPCR). A fim de comparar os marcadores inflamatórios em diferentes fases (aguda e convalescente), seis indivíduos realizaram uma recoleta sanguínea após 20 dias do início dos sintomas. O grupo controle, formado por doadores saudáveis, foi constituído a partir de 49 amostras recrutadas na Central Goiana de Sorologia e Imunohematologia (**Figura 9**).

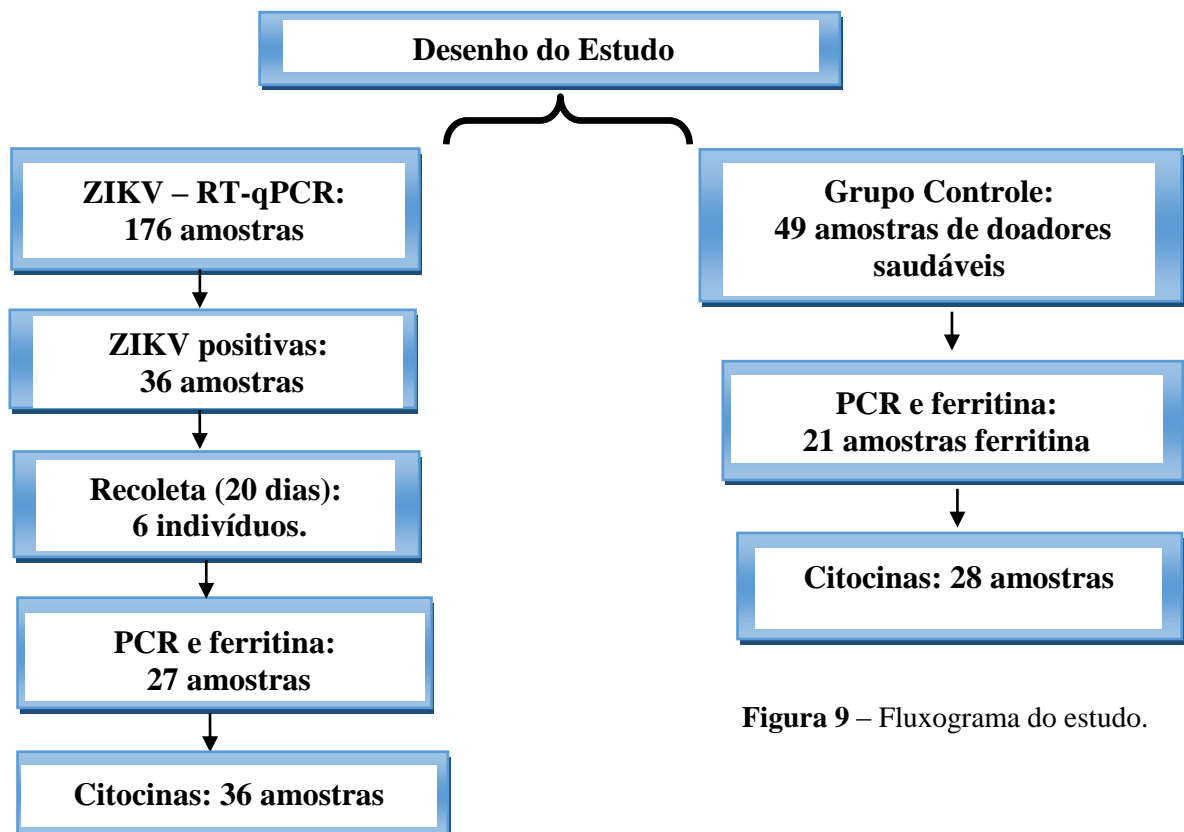


Figura 9 – Fluxograma do estudo.

2.2 QUESTIONÁRIO

Os participantes do estudo responderam um breve questionário abordando aspectos como dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais (**Apêndice II**).

2.3 AMOSTRAS DE SANGUE

Foram coletados de cada paciente 10 mL de sangue com anticoagulante ácido etilenodiamino tetra-acético –EDTA. Após a coleta, o sangue foi centrifugado por 5 minutos a 2.500 rpm, e conduzido a capela de fluxo laminar para separação do plasma. Esse foi armazenado em freezer -80°C e posteriormente utilizado para a extração do RNA viral, dosagem das proteínas inflamatórias (PCR e ferritina) e citocinas, inflamatórias e anti-inflamatórias.

2.4 EXTRAÇÃO DE RNA

O RNA total foi obtido a partir do plasma dos pacientes pelo kit *QIAamp®Viral RNA Mini* (QIAGEN, Hilden, Alemanha). Nesta etapa ocorreu a ligação seletiva do vírus em uma membrana à base de gel-sílica sob o processo de microcentrifugação. Todo o processo de extração ocorreu na capela de fluxo laminar, com todos os cuidados referentes a extração de RNA, como a utilização de microtubos, pipetadores e ponteiros *RNAse free*.

Primeiramente, cada amostra de plasma (140 µL) foi adicionada em um tubo de microcentrífuga de 1,5 ml, contendo 560 µL de tampão AVL preparado com tampão AVE e RNA transportador. Em seguida, adicionou-se 4 µL do controle interno de RNA (Plasmídeo TRIS-HCl) e a solução foi incubada à temperatura ambiente (15-25°) por 10 minutos.

A solução foi posteriormente centrifugada e 560 µL de etanol foram adicionados a mesma, que foi misturada por vórtex, novamente centrifugada e transferida para a coluna do QIAamp Mini, com uma nova centrifugação de 8.000 rpm por 1 minuto.

Após esse processo, 500 µL de tampão AW1 foi adicionado a coluna do QIAamp Mini e essa foi centrifugada a 8.000 rpm por 1 minuto. O mesmo procedimento foi realizado com o tampão AW2, no entanto com uma centrifugação de 14.000 rpm por 3 minutos. Por fim, o RNA final foi eluído em 50 µL de tampão (AVE).

2.5 DETECÇÃO DO RNA VIRAL PARA CONFIRMAÇÃO DA INFECÇÃO

O kit para detecção do RNA viral utilizado foi o *Zika Vírus PCR* (Bioclin®, Lote 004, MS: 10269360300, Registro ANVISA 10269360300), desenvolvido segundo as recomendações do CDC (Centers for Disease Control and Prevention, USA) e que apresenta como gene alvo de amplificação a **poliproteína 5'UTR**. O processo foi constituído das seguintes etapas: Preparo dos Reagentes, Diluição do Padrão Quantitativo, Preparo da PCR e Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real.

Preparo dos Reagentes

Todos os reagentes foram centrifugados antes da abertura dos tubos. Posteriormente, a solução de PCR (R1), solução de PCR CI (R4) e controle interno (R5) foram ressuspensos com o reagente água (R9) e o reagente Mix Taq (R2) com 525 µL do Tampão Mix (R3). Os demais reagentes estavam prontos para uso.

Diluição do Padrão Quantitativo

O Padrão A (R7) foi ressuspensado com 500 µL do Diluente (R8). Posteriormente, para a diluição seriada do Padrão A (R7), 3 microtubos (A, B e C) foram separados e 90 µL do diluente (R8) foi pipetado nos mesmos. Em seguida, pipetou-se 10 µL do Padrão A (R7) no microtubo B e a solução foi homogeneizada. Trocou-se a ponteira e pipetou-se 10 µL do microtubo B no C e a solução foi homogeneizada. O mesmo procedimento foi realizado do microtubo C para o D. No final da diluição tivemos o padrão A, B, C e D com as seguintes concentrações:

Padrão A - 2×10^5 cópias/µL;

Padrão B - 2×10^4 cópias/µL;

Padrão C - 2×10^3 cópias/µL;

Padrão D - 2×10^2 cópias/µL.

Preparo da PCR

Os poços na placa de PCR (*Light Cycler®480, Multiwell Plate 96, White, Roche, REF 04 729 692 001, Lote 14030400*) foram separados segundo o número de amostras, controles e padrões quantitativos. Então, o volume da solução de PCR final foi preparado em um microtubo baseado no número de reações realizadas, de acordo com a tabela abaixo (**Quadro 1**):

Reagentes	1 Reação	25 Reações	50 Reações	100 Reações
Mix Taq (R2)	10 µL	250 µL	500 µL	1 mL
Solução de PCR (R1)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Solução de PCR Cl (R4)	1 µL	25 µL	50 µL	100 µL
Água (R9)	3 µL	75 µL	150 µL	300 µL

Quadro 1 – Preparo da solução de PCR final para detecção do RNA viral do ZIKV.

Posteriormente, pipetou-se 15 µL da solução de PCR final nos poços selecionados para as reações e em seguida adicionou-se 5µL dos padrões e RNA extraído das amostras em seus respectivos poços e homogeneizou-se bem.

Definições do Termociclador para a PCR em Tempo Real

A detecção do RNA viral e do controle da extração nas amostras foi realizada pelo termociclador PCR Real Time (*Light Cycler® 480 II, Roche*). A curva padrão e a detecção do ZIKV foi obtida pelo detector fluorescente FAM (465-510 nm), e o controle pelo VIC (533-580 nm).

2.8 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA

A PCR foi dosada no plasma por meio do kit *CRP ultrasensível Turbidimetria do látex, Spinreact* (REF 43134, Lote 3049) e equipamento *Selectra XL*.

Todos os reagentes líquidos estavam prontos para serem usados, e só foi necessário preparar as diluições do calibrador. Essa foi feita em NaCl 9g/L, e a concentração do

calibrador multiplicada pelo fator correspondente indicado na tabela abaixo (**Quadro 2**), para obtenção da concentração de PCR de cada diluição.

Diluição do Calibrador	1	2	3	4	5	6
Calibrador PCR-u (µL)	---	5	10	25	50	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	95	90	75	50	---
Fator	0	0,05	0,1	0,25	0,5	1,0

Quadro 2 – Diluição do calibrador para PCR.

Então, os reagentes e suporte de cubetas foram colocados no equipamento a 37°C e as condições do ensaio foram preparadas, o comprimento de onda foi ajustado para 540nm e o passo de luz na cubeta adequado para 1 cm. Em seguida, o equipamento foi zerado com água destilada e na cubeta pipetou-se 0,8 mL de diluente (R1) e 0,2 mL de látex (R2), ambos foram homogeneizados e a lidos, gerando o resultado do reagente branco. Posteriormente, a amostra/calibrador foi adicionada na cubeta e a leitura feita 4 minutos após a adição da mesma (o). Resultados abaixo de 3mg/L são considerados normais.

2.6 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DE FERRITINA

A ferritina foi dosada no plasma por meio do kit *Turbilatex Ferritina ultrasensível, Spinreact* (REF 1107140) e equipamento *Selectra XL*.

Primeiramente, o calibrador foi reconstituído com 3,0 mL de água destilada, suavemente homogeneizado e incubado 10 minutos à temperatura ambiente. As diluições da curva de calibração foram realizadas por meio da utilização de NaCl 9 g/L. A concentração de cada diluição foi obtida pela multiplicação com o fator de diluição, de acordo com a tabela abaixo, (**Quadro 3**):

Diluição do Calibrador	1	2	3	4
Calibrador FERR (µL)	---	33,3	66,6	100
NaCl 9 g/L (µL)	100	66,6	33,3	---
Fator	0	1/3	2/3	0

Quadro 3 – Diluição do calibrador para ferritina.

Após esse processo, os reagentes e o suporte de cubetas foram colocados a 37°C, a luz no cubetas adaptada para 1cm e o comprimento de onda para 540 nm. O equipamento foi ajustado para zero com água destilada e no cubetas pipetou-se 800 µL de diluente (R1), 200 µL de látex (R2) e 90 µL do (a) calibrador/amostra. A solução foi homogeneizada e a leitura da absorvância realizada imediatamente (A1) e após 5 minutos (A2) da adição do (a) calibrador/amostra.

2.7 QUANTIFICAÇÃO DOS NÍVEIS DAS CITOCINAS INFLAMATÓRIAS E ANTI-INFLAMATÓRIAS

A análise de citocinas foi realizada na Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) do Rio de Janeiro. As concentrações das citocinas foram determinadas no plasma dos pacientes por meio de um imunoenensaio com microesferas do tipo multiplex. As amostras foram avaliadas para IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-9, IL-12p70, IL-15, IL-17A, IL-4, IL-10, IL-13 e IL-1ra, usando um kit comercial (Lincoplex, Millipore, Missouri, USA) e um analisador Luminex (Luminex®, MiraiBio, Alameda, CA). O procedimento foi feito da seguinte forma: inicialmente o *layout* da placa foi definido e o número total de poços determinado, em seguida o analisador Luminex foi ajustado para o ensaio e os padrões e *beads* preparados. Então, adicionou-se 50 µL das *beads* nos poços, com posterior lavagem com tampão *Bioplex*. Os padrões, branco e amostras foram adicionados (50 µL de cada em seu respectivo poço) e a placa foi incubada à temperatura ambiente sob agitação 850 rpm, protegida da luz com papel alumínio. Após esse processo, a placa foi lavada três vezes com tampão *Bioplex* e então adicionou-se 25 µL de anticorpo de detecção em cada poço, com imediata incubação de 30 minutos em temperatura ambiente sob agitação de 850 rpm. Logo depois, foram realizadas três lavagens com 100 µL de tampão *Bioplex* e adicionado 50 µL de estreptavidina – PE em cada poço, com incubação de 10 minutos à temperatura ambiente sob agitação de 850 rpm. Novamente realizou-se três lavagens com tampão *Bioplex*, o material foi ressuspendido em 125 µL de tampão e agitado a 850 rpm por 30 segundos. Por fim, a leitura da placa foi realizada pelo analisador Luminex e os níveis das citocinas foram expressos em pg/mL.

2.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados demográficos (idade e sexo), epidemiológicos (zona de residência e viagem anterior a 30 dias), clínicos (principais manifestações clínicas) e laboratoriais (tempo de coleta das amostras sanguíneas após manifestação de sinais e sintomas) foram analisados com o programa *Microsoft Excel*. Os resultados das proteínas e citocinas inflamatórias foram expressos como mediana e analisados estatisticamente com o programa *GraphPad Prism versão 5* (*Graphpad software*, San Diego, CA, USA).

A comparação entre os níveis de PCR, ferritina e citocinas dos pacientes ZIKV positivos com o grupo controle e a comparação de seus níveis em fase aguda e convalescente, foi realizada por teste não paramétrico, *Mann-Whitney U test*, com Intervalo de Confiança de 95% (IC95). A análise dos níveis de PCR, ferritina e citocinas nas fases aguda e convalescente foi feita por teste T pareado. A correlação entre os níveis de PCR e citocinas *versus* a quantidade de manifestações clínicas foi realizada pela correlação não-paramétrica de Spearman. Os resultados foram considerados estatisticamente significativos quando $p < 0,05$.

2.9 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Os indivíduos dispostos a participar voluntariamente da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (**Apêndice I**), sob a prerrogativa do Comitê de Ética da PUC-GOÍÁS pelo parecer CAAE: 57696716.9.0000.0037 (**Anexo I**).

3 RESULTADOS

3.1 CARACTERÍSTICAS DOS PACIENTES DO ESTUDO, ZIKV POSITIVOS E DOADORES SAUDÁVEIS

A população estudada foi constituída de 176 indivíduos, 55 homens (31,2%) e 121 mulheres (68,8%), e apresentou média de idade de 36 anos. As 176 amostras dos indivíduos que apresentavam suspeita de infecção pelo ZIKV foram submetidas a análise por PCR em Tempo Real, sendo 36 positivas para o ZIKV. O grupo controle apresentou média de idade de 35 anos.

Quando os indivíduos positivos para o ZIKV foram questionados quanto a viagem anterior a 30 dias antes da manifestação clínica de sinais e sintomas, 14 (38,8%) relataram viagem, 12 (33,3%) não se deslocaram de Goiânia e 10 (27,9%) não informaram. Em relação a zona de residência, 28 (77,7 %) foram moradores da zona urbana – Goiânia e 8 (22,3%) não informaram.

As principais manifestações clínicas, sinais e sintomas, relatadas pelos indivíduos positivos para o ZIKV (n=36) foram: exantema maculopapular pruriginoso 30 (83,3%), cefaleia 22 (61,1%), febre 18 (50%), mialgia 18 (50%) e artralgia 18 (50%) (**Tabela 1**). Vale ressaltar que os 140 indivíduos que foram negativos por PCR em Tempo Real apresentaram sintomatologia similar a dos indivíduos mencionados acima.

Tabela 1 – Principais manifestações clínicas apresentadas pelos indivíduos positivos para o ZIKV.

<i>Variável</i>	<i>n (%)</i>
<i>Exantema Maculopapular</i>	30 (83,3)
<i>Pruriginoso</i>	
<i>Cefaleia</i>	22 (61,1)
<i>Febre</i>	18 (50)
<i>Mialgia</i>	18 (50)
<i>Artralgia</i>	18 (50)
<i>Hiperemia Conjuntival</i>	13 (36,1)
<i>Edema</i>	10 (27,7)
<i>Náuseas</i>	8 (22,2)
<i>Linfonodo Enfartado</i>	6 (16,6)
<i>Diarréia</i>	4 (11,1)

As amostras que apresentaram positividade foram colhidas principalmente no 2º dia de manifestação de sinais e sintomas. No entanto, tivemos uma amostra obtida no 15º dia que também foi positiva para o ZIKV (**Tabela 2**).

Tabela 2 – Tempo de coleta das amostras sanguíneas após manifestação clínica, sinais e sintomas.

Tempo de Coleta	N	%
2º dia	9	25,0
3º dia	7	19,4
4º dia	7	19,4
5º dia	1	2,8
6º dia	3	8,3
8º dia	3	8,3
9º dia	1	2,8
15º dia	1	2,8
Não informado	4	11,2
TOTAL	36	100

3.2 QUANTIFICAÇÃO DE PROTEÍNA C REATIVA NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E GRUPO CONTROLE

Como apresentado na **Figura 9**, a PCR foi quantificada em 27 indivíduos infectados pelo ZIKV na fase aguda e em 21 indivíduos do grupo controle. Os níveis de PCR no grupo controle variaram entre 0,3 a 2,5 mg/L. Entretanto, os indivíduos infectados com o ZIKV apresentaram valores mais elevados, entre 0,4 a 30 mg/L, com diferença estatística $p < 0,0001$, (**Figura 10**).

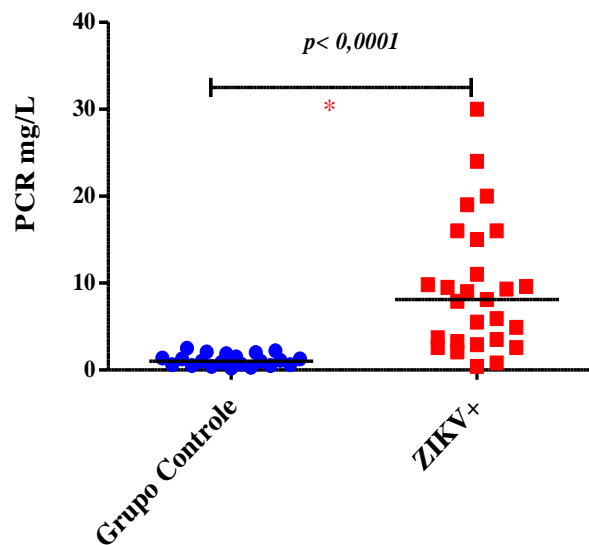


Figura 10 – Quantificação de Proteína C Reativa no grupo controle e infectados pelo ZIKV na fase aguda. *Mann-Whitney U test* (mediana).

A fim de verificar se os indivíduos que apresentavam uma maior quantidade de sinais e sintomas possuíam maiores níveis de PCR, ambos os aspectos foram correlacionados, no entanto essa análise não foi significativa, $p = 0,989$.

3.3 QUANTIFICAÇÃO DE FERRITINA NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E GRUPO CONTROLE

A comparação dos níveis de ferritina no grupo controle (n=21) e infectados pelo ZIKV na fase aguda (n=27), não apresentou diferença estatística ($p= 0,7552$). Os níveis no grupo controle variaram entre 0,0 e 397,0 mg/L, nos infectados pelo ZIKV esses estiveram entre 12,5 e 726 mg/L, **Figura 11**.

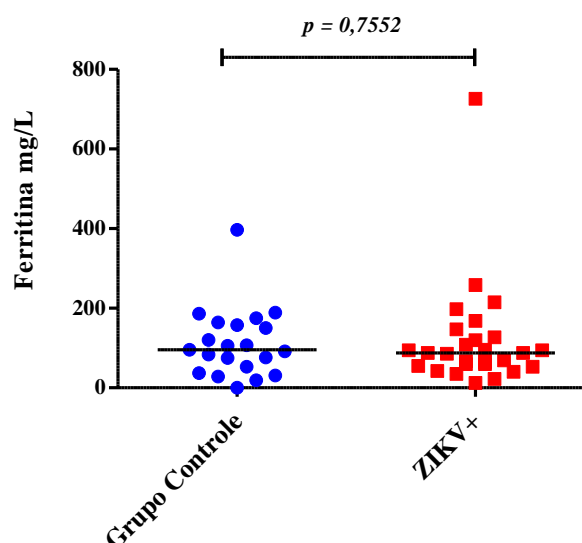


Figura 11 - Quantificação de ferritina no grupo controle e infectados pelo ZIKV na fase aguda. *Mann-Whitney U test* (mediana).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL-12p70, IL-15, IL-17A) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E GRUPO CONTROLE

Quando avaliados os níveis das citocinas inflamatórias, observou-se um aumento de IL-5, IL-7 e IL-9 nos indivíduos infectados com o ZIKV (**Figura 12**).

A síntese de IL-5 esteve aumentada nos indivíduos positivos para o ZIKV quando comparado aos níveis produzidos pelo grupo controle, $p= 0,0129$. O mesmo foi observado para a IL-7 ($p= 0,0066$) e IL-9, ($p=0,0398$) (**Figura 12 A, B e C**).

As citocinas inflamatórias IL-1 β , IL-2, IL-6, IL-12p70, IL-15 e IL-17A não apresentaram resultados com diferenças significativas (**Figura 13**).

A produção de IL-1 β pelos indivíduos infectados com o ZIKV teve padrões semelhantes a síntese do grupo controle ($p= 0,3014$). O primeiro grupo apresentou valores entre 0,298 a 6,654 pg/mL e o segundo entre 0,298 a 4.481 pg/mL (**Figura 13 A**).

Quanto a expressão de IL-2, os indivíduos positivos para o ZIKV tiveram resultados entre 0,600 pg/mL a 65,121 pg/mL, e $p= 0,0581$ (**Figura 13 B**).

Assim como a IL-1 β e IL-2, a IL-6 não esteve aumentada nos indivíduos infectados com o ZIKV ($p=0,1670$). O grupo controle apresentou o valor mais alto de 24,058 pg/mL e os doentes tiveram como pico o valor de 63,205 pg/mL (**Figura 13 C**).

Quanto aos níveis de IL-12p70, IL-15 e IL-17A, não se observou diferença estatística quando comparado os infectados pelo ZIKV com os indivíduos do grupo controle, $p=0,3267$, $p=0,0761$ e $p=0,6085$, respectivamente (**Figura 13 D, E e F**).

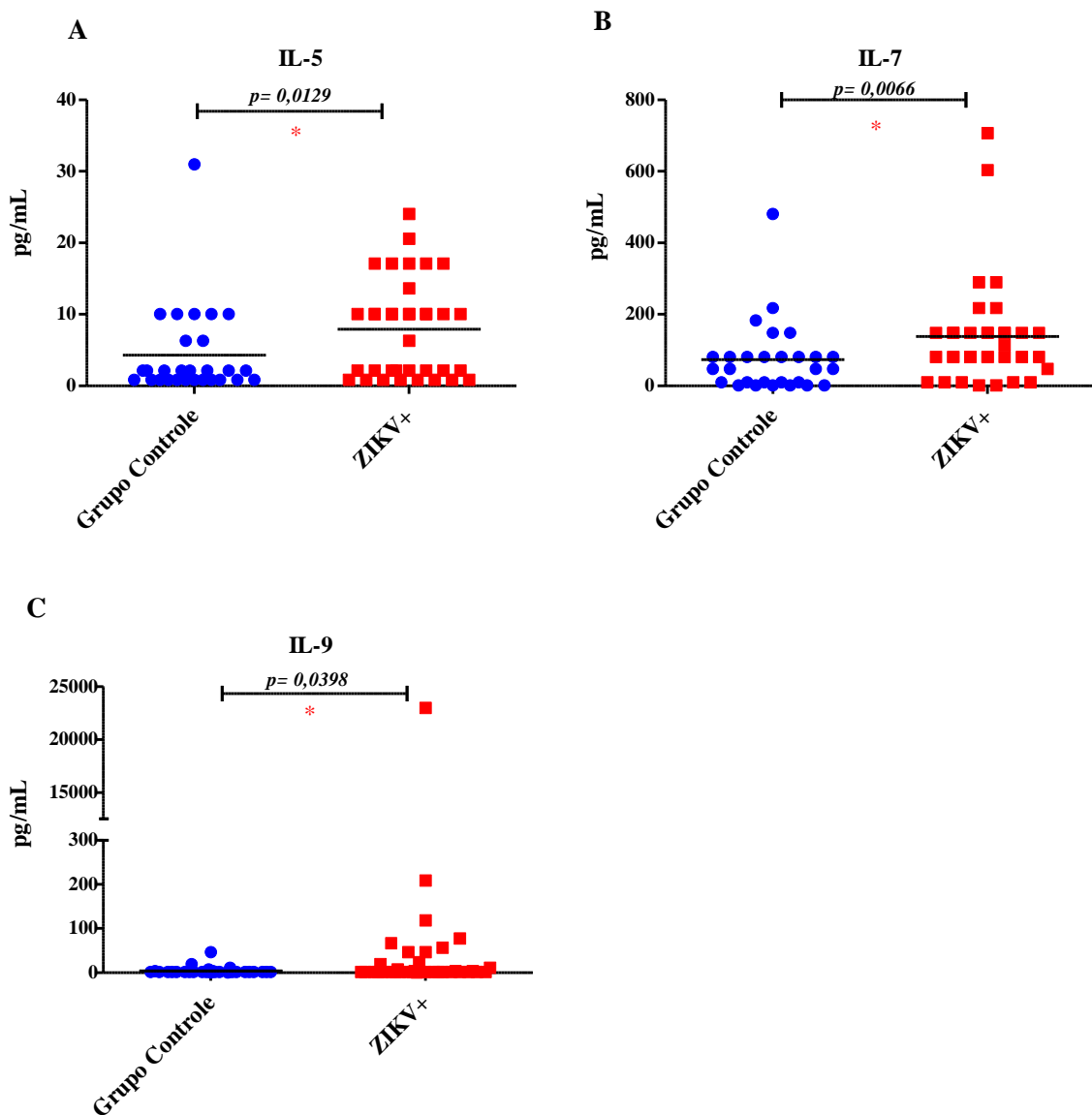


Figura 12 - Quantificação das citocinas inflamatórias IL-5 (A), IL-7 (B), IL-9 (C) em indivíduos infectados com o ZIKV e grupo controle. *Mann-Whitney U test* (mediana).

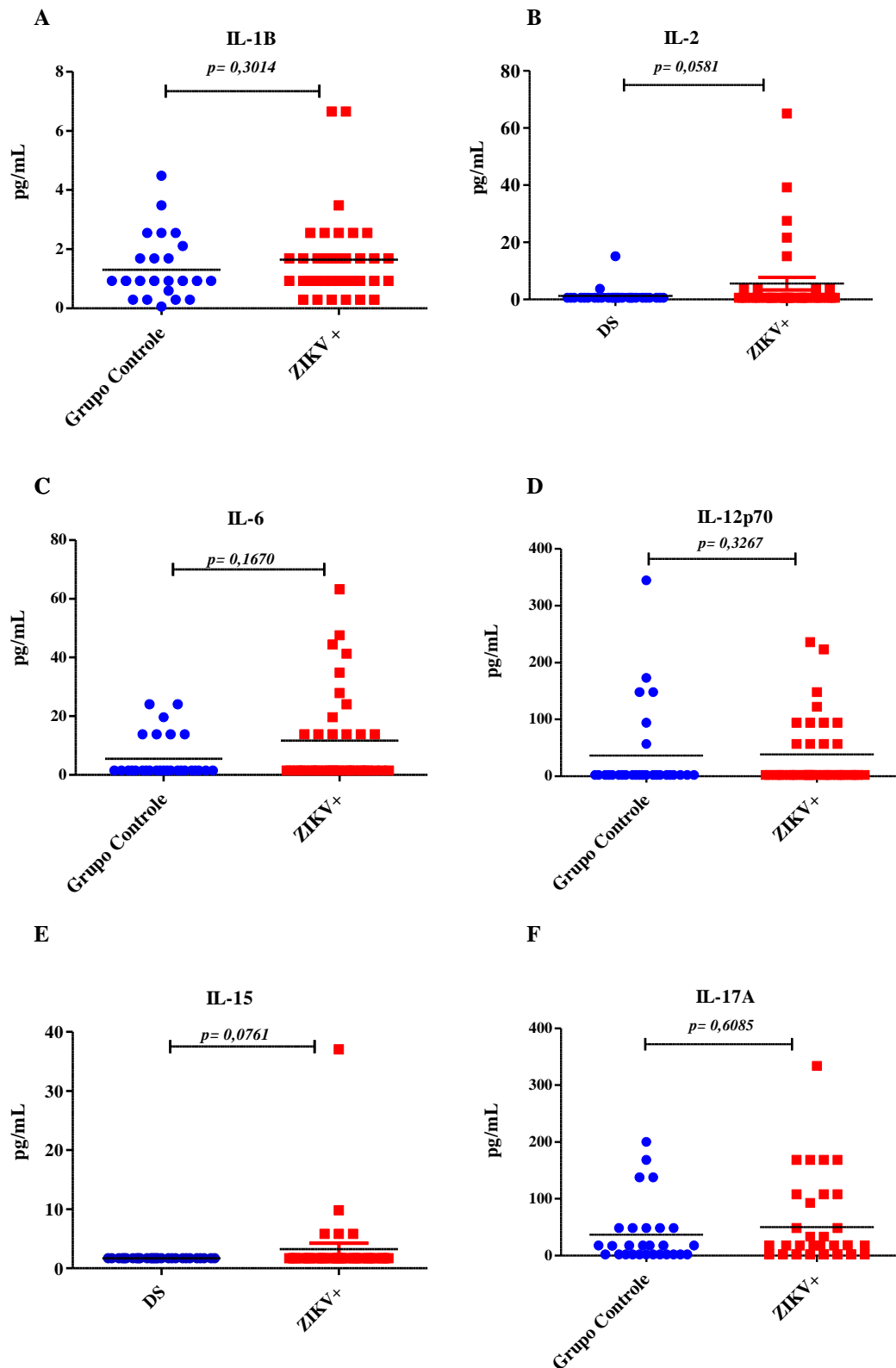


Figura 13 – Quantificação das citocinas inflamatórias IL-1 β (A), IL-2 (B), IL-6 (C), IL-12p70 (D), IL-15 (E) e IL-17A (F) em indivíduos infectados com o ZIKV e grupo controle. *Mann-Whitney U test* (mediana).

3.4 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-1ra, IL-4, IL-10 e IL-13) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E GRUPO CONTROLE

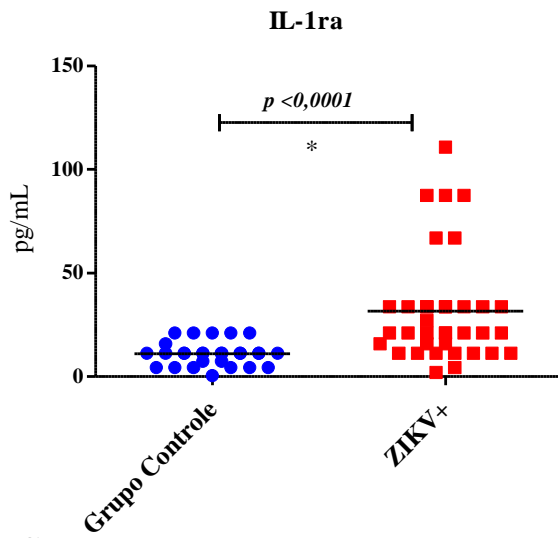
O IL-1ra apresentou resultados com expressiva significância, enquanto que as demais citocinas anti-inflamatórias não demonstraram nenhuma alteração significativa quando comparadas com os controles (**Figura 14**).

A diferença significativa mais marcante do estudo foi a do receptor IL-1ra ($p < 0.0001$), com níveis que variaram entre 0,603 a 21,060 pg/mL no grupo controle, e 2,110 a 110,807 pg/mL nos indivíduos positivos para o ZIKV (**Figura 14 A**).

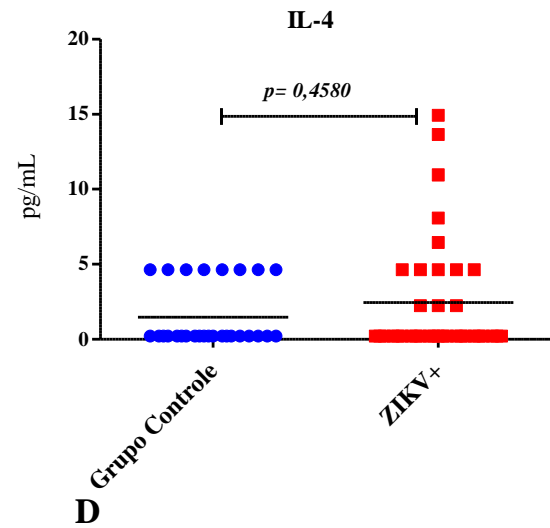
Os níveis mais baixos de IL-4 foram 0, 204 pg/mL para ambos os grupos, ZIKV+ e grupo controle, contudo os infectados pelo ZIKV apresentaram pico de 14,919 pg/mL e o grupo controle de 4,637 pg/mL, ($p=0,4580$) (**Figura 14 B**).

Assim como a IL-4, a IL-10 e IL-13 não apresentaram diferença estatística, $p= 0,2239$ (**Figura 14 C**) e $p=0,1140$ (**Figura 14 D**), respectivamente.

A



B



C

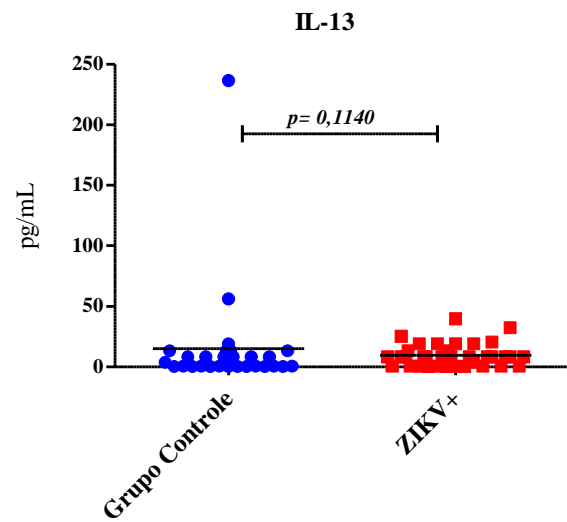
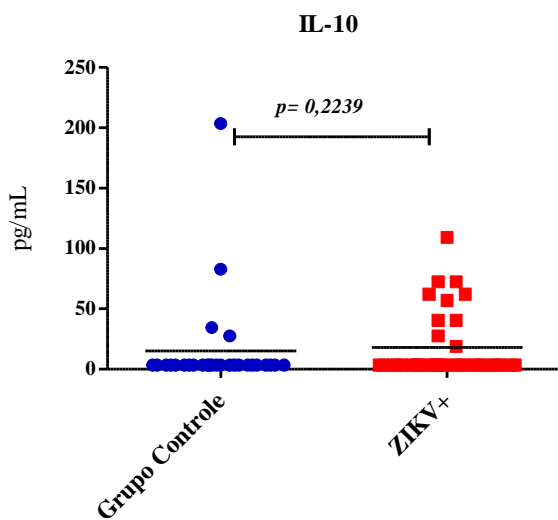


Figura 14 – Quantificação das citocinas anti-inflamatórias IL-1ra (A), IL-4 (B), IL-10 (C) e IL-13 (D) em indivíduos infectados com o ZIKV e grupo controle. *Mann-Whitney U test* (mediana).

3.5 QUANTIFICAÇÃO DA PROTEÍNA C REATIVA NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE

A proteína C Reativa foi quantificada em duas fases distintas da infecção, aguda e convalescente. Na fase aguda houve o aumento da PCR, e a posteriori seus níveis retornaram a níveis basais (**Figura 15**), que podem ser comparados aos dos indivíduos do grupo controle, já mencionados na **Figura 10**. A análise de ambas as fases demonstrou uma tendência para um resultado com diferença estatística ($p= 0,0535$).

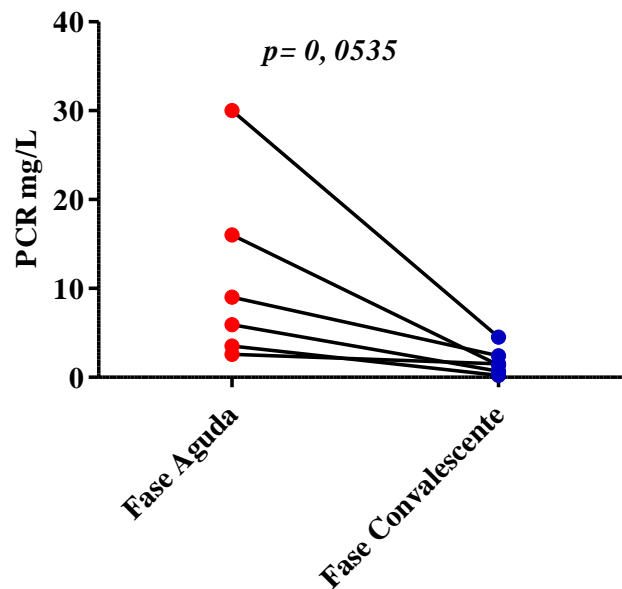


Figura 15 – Quantificação da PCR nos indivíduos infectados pelo ZIKV em diferentes fases, aguda e convalescente. *Teste T pareado*.

3.6 QUANTIFICAÇÃO DE FERRITINA NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE

Na fase aguda a ferritina apresentou valores que variaram entre 42,1 mg/L a 119,6 mg/L, enquanto que a fase convalescente teve resultados entre 27,5 mg/L a 160,3 mg/L. Quando comparados os níveis da fase aguda e convalescente, não houve diferença estatística ($p= 0,2746$) (**Figura 16**).

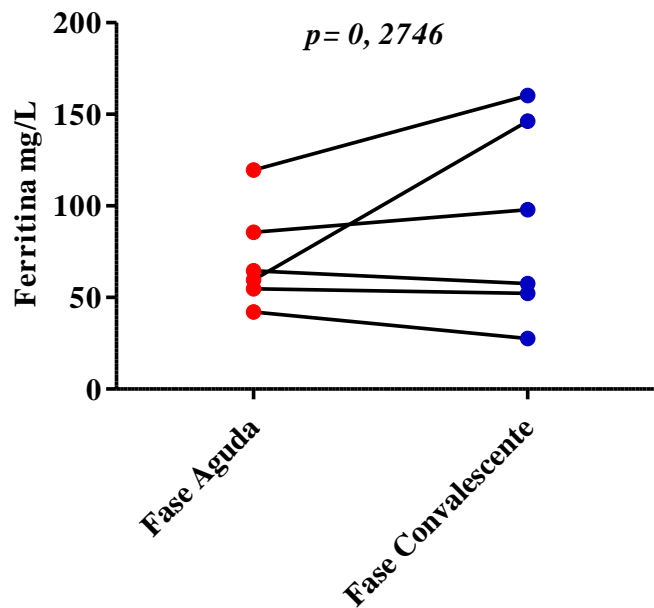


Figura 16 - Quantificação de ferritina nos indivíduos infectados pelo ZIKV em diferentes fases, aguda e convalescente. *Teste T pareado*.

3.7 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS INFLAMATÓRIAS (IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-7, IL12p70, IL-15, IL-17A) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE

Os níveis das citocinas IL-1 β , IL-2, IL-5, IL-6, IL-9, IL-12p70, IL-15 e IL-17A não apresentaram diferença estatística na fase aguda e convalescente. No entanto, houve uma redução na expressão de IL-7 na fase convalescente, exibindo resultados com diferença estatística ($p=0,0340$) (**Figura 17**).

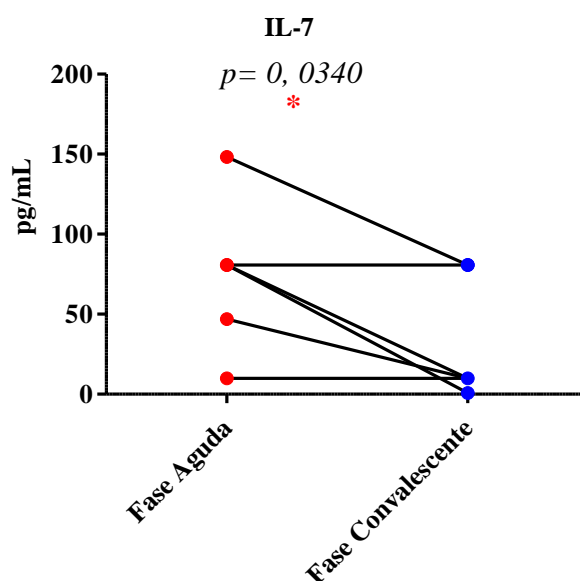


Figura 17 - Quantificação de IL-7 de seis indivíduos ZIKV positivos na fase aguda e convalescente. *Teste T pareado.*

3.8 QUANTIFICAÇÃO DE CITOCINAS ANTI-INFLAMATÓRIAS (IL-1ra, IL-4, IL-10 E IL-13) NOS INDIVÍDUOS ZIKV POSITIVOS NA FASE AGUDA E CONVALESCENTE

Quando comparados os níveis das citocinas anti-inflamatórias na fase aguda e convalescente, não observou-se uma análise estatística significativa (IL-1ra, $p=0,2078$), (IL-4, $p=1,0000$), (IL-10, $p=0,1906$), (IL-13, $p=0,8755$).

3.9 CORRELAÇÃO ENTRE AS MANIFESTAÇÕES CLÍNICAS E NÍVEIS DAS CITOCINAS IL-2, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15 E IL-1ra

Quando correlacionados os níveis das citocinas inflamatórias IL-2, IL-5, IL-7, IL-9, IL-15 e do receptor IL-1ra, não observou-se diferença estatística. Entretanto, os resultados da IL-5 demonstraram uma tendência a uma correlação significativa, $p=0,0574$ (**Figura 18**).

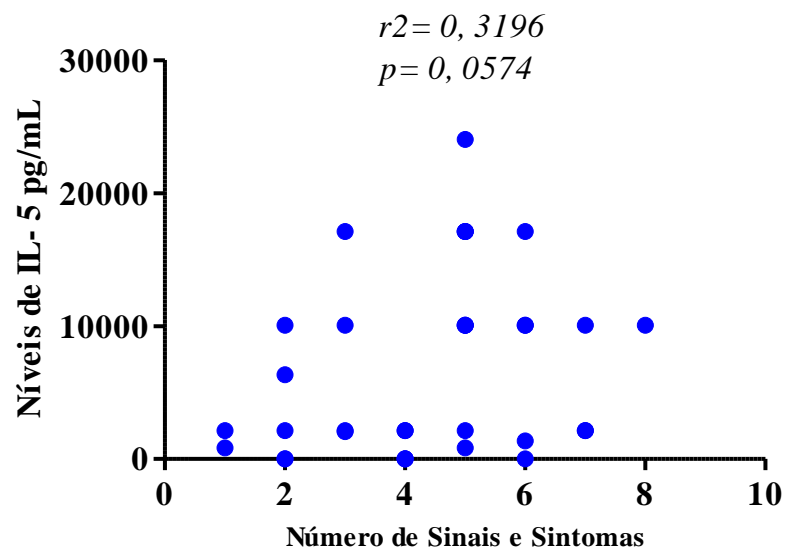


Figura 18 – Correlação dos níveis de IL-5 e número de manifestações clínicas apresentadas pelos infectados pelo ZIKV. Os sinais e sintomas clínicos foram somados e correlacionados com os níveis das citocinas pela correlação não-paramétrica de *Spearman*.

4 DISCUSSÃO

Em nosso estudo, houve a predominância de participação do sexo feminino. Da mesma forma, um estudo no Rio de Janeiro (BRASIL *et al.*, 2016) identificou 262 casos suspeitos de infecção pelo ZIKV, sendo a grande maioria 158 (60,3%) do sexo feminino. A maior presença de mulheres nos estudos pode ser explicada por características comportamentais, uma vez que as mulheres se preocupam mais com a saúde por questões estéticas e por se prepararem para a maternidade, enquanto que os homens muitas vezes são mais resistentes e têm objeção em demonstrar suas limitações (TONELI; SOUZA; MULLER, 2010; BRASIL *et al.*, 2016).

Em relação manifestações clínicas relatadas pelos indivíduos infectados pelo ZIKV, as principais foram: exantema maculopapular pruriginoso, cefaleia, febre, mialgia, artralgia e hiperemia conjutival, consistente com a definição de caso suspeito estabelecida pela *Pan American Health Organization* (PAHO/WHO, 2015). Os relatos também coincidiram com os sinais e sintomas clínicos relatados pelos pacientes infectados pelo ZIKV durante a epidemia na Polinésia Francesa, em que a sintomatologia mais frequentemente observada foi febre baixa, exantema maculopapular pruriginoso, artralgia e conjuntivite (MUSSO; NILLES; CAO-LORMEAU, 2014). Essa similaridade de sintomas entre os pacientes da Polinésia Francesa e nossos pacientes pode ser explicada pelo fato de ambas as epidemias terem sido ocasionados pela linhagem asiática do ZIKV. Um estudo molecular do material genético viral constatou que o vírus circulante no Brasil tem como ancestral comum o ZIKV que circulou na Polinésia Francesa em 2013 (BARONTI *et al.*, 2014; PINTO JUNIOR *et al.*, 2015; CHANG *et al.*, 2016; FARIA *et al.*, 2016).

Quando questionados quanto a forma de moradia, 77,7% dos indivíduos moravam na zona urbana, no município de Goiânia, permitindo-nos afirmar que o ZIKV estava circulante na capital entre os meses de fevereiro e março de 2016. Em relação a viagem antecedente há 30 dias antes da coleta de amostra biológica para o estudo, 14 (38,8%) dos participantes se deslocaram para outras regiões antes da manifestação da doença e 12 (33,3%) não viajaram. Tal acontecimento nos permitiria aludir a possibilidade de infecção em outros estados nos pacientes que viajaram e a aquisição da doença em Goiânia pelos indivíduos que não viajaram, apesar da Lista Nacional de Notificação Compulsória do ZIKV considerar Goiás um estado sem casos de transmissão autóctone nesse período (SVS-MS, 2016c).

Em nosso estudo as amostras que apresentaram positividade para o ZIKV foram colhidas principalmente nos quatro primeiros dias de apresentação clínica da doença, com uma maior prevalência no 2º dia, corroborando com as diretrizes da *European Centre for Disease Prevention and Control* (ECDC, 2016) que afirma que um ótimo diagnóstico molecular para o ZIKV em amostras sanguíneas ocorre nos quatro primeiros dias da infecção. Como o diagnóstico da febre Zika baseia-se na detecção do ácido nucleico viral nas espécimes clínicas, o curto período virêmico torna a detecção viral muito limitada, e por isso para se obter um diagnóstico bem sucedido é necessário que o exame seja realizado nos sete primeiros dias da doença (REIS, 2015).

Apesar disso, tivemos uma amostra positiva no plasma 15º dia após manifestação de sinais e sintomas clínicos, o que é um episódio mais raro, no entanto também já observado por outros autores no soro, plasma e sangue total. O RNA viral foi detectado no soro de uma gestante com indícios de infecção congênita aproximadamente 10 semanas após o início dos sintomas (DRIGGERS *et al.*, 2016), e em indivíduos imunocompetentes observou-se positividade no plasma até 37 dias após a manifestação clínica da doença e no sangue total até 100 dias (Mansuy *et al.*, 2017).

É fato que a detecção do RNA viral assegura um diagnóstico conclusivo, entretanto de acordo com o *Centers for Disease Control and Prevention* (CDC, 2016), um resultado negativo não exclui a possibilidade de infecção pelo ZIKV. Assim, a semelhança das manifestações clínicas entre os casos positivos e negativos sustentam que a maioria dos casos eram positivos, no entanto a viremia transitória dificultou a detecção do material genético viral e confirmação da doença.

Em relação à parte imuno-inflamatória da infecção focamos no estudo da Proteína C Reativa, ferritina, citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias, a fim de identificar possíveis alterações durante o curso da doença.

Ao avaliar a produção da PCR observamos que o padrão desta proteína apresentou-se significativamente elevado nos indivíduos infectados pelo ZIKV na fase aguda quando comparado aos níveis dos indivíduos saudáveis ($p < 0,0001$). Ao se correlacionar os níveis da PCR de diferentes fases da doença, aguda e convalescente, observou-se um aumento dessa proteína na fase aguda com retorno a níveis normais na fase convalescente, $p = 0,0535$. Apesar de não haver estudos específicos relacionando diretamente a PCR e o ZIKV, o que reforça a importância do nosso estudo, existem descrições do aumento dessa proteína nesses indivíduos (CUNHA *et al.*, 2016; RODRIGUES; BOUÇAS; ERRANTE, 2016; SBPC/ML, 2016).

Apesar disso, um relato de caso descreveu um paciente com febre Zika e GBS que apresentou valores normais para esse marcador (SIU *et al.*, 2016).

A PCR é um ótimo marcador de fase aguda da inflamação que apresenta-se elevado em infecções virais (AGUIAR *et al.*, 2013). Essa informação suporta o aumento dessa proteína em nosso estudo na fase aguda com regressão a níveis normais na fase convalescente. Vale ressaltar que em nosso estudo, os níveis de PCR variaram até a faixa de 30 mg/L, condizendo com os valores relativos à doenças ocasionadas por vírus, 10-40 mg/L (AGUIAR *et al.*, 2013).

A PCR é uma proteína de fase aguda produzida pelos hepatócitos em resposta ao estímulo de citocinas inflamatórias, como IL-1 β e principalmente IL-6 (VOLP *et al.*, 2008; SILVA; LACERDA, 2012). Como em nosso estudo, essas citocinas não apresentaram um aumento significativo, acreditamos que outros mediadores podem ser responsáveis por estimular esse aumento. Dentre esses mediadores, Mayeri *et al.* (2010) destacam o papel do Fator de Necrose Tumoral (TNF- α) na síntese da PCR. Apesar disso, outro integrante do nosso grupo de pesquisa, SILVA *et al.*, 2016, avaliou os níveis de TNF-alfa na nossa coorte e os resultados não demonstraram diferença estatística ($p=0,6787$). Acreditamos que esse fato possa ser explicado pelo tempo de meia vida curta desse fator, 20 minutos (OLIVEIRA *et al.*, 2011), uma vez que as amostras biológicas foram coletadas após o 2º dia de aparecimento de sinais e sintomas clínicos.

Ao se avaliar a correlação dos níveis da PCR *versus* as manifestações clínicas apresentadas pelos infectados pelo ZIKV, observamos que não houve uma correlação significativa, $p=0,989$. Existem estudos que correlacionam os valores de PCR com a gravidade clínica da patologia (COSTA *et al.*, 2009; CORREA *et al.*, 2002). Costa *et al.*, 2009 demonstrou a PCR como marcador de gravidade clínica em pacientes com bronquiolite, sendo os níveis dessa proteína significativos em quadros mais severos da doença. Apesar disso, nossos dados demonstraram que níveis superiores de PCR não representavam uma maior quantidade de manifestações clínicas.

Contraditoriamente aos níveis de PCR, a ferritina, outra proteína de fase aguda avaliada em nosso estudo, não demonstrou diferença significativa em nenhum momento da infecção, $p>0,05$. Apesar disso, diversos trabalhos já apontaram o aumento desse marcador em infectados pelo ZIKV (CUNHA *et al.*, 2016; RODRIGUES; BOUÇAS; ERRANTE, 2016; SBPC/ML, 2016). O nosso resultado pode ser explicado pelos baixos níveis de IL-1 β e IL-6, pela gravidade da doença, ausência de uma ativação imune expressiva e pelos valores dos doadores saudáveis.

Durante processos inflamatórios, a síntese de ferritina é estimulada por citocinas inflamatórias, como IL-1 β e IL-6 (GROTTO, 2010). Além disso, níveis elevados de ferritina foram associados a graves complicações e óbito (CHAIYARATANA *et al.*, 2008; LAKS, 2010). Como em nosso estudo a IL-1 β e IL-6 não apresentaram um aumento significativo e a febre Zika é na maioria dos casos uma infecção de caráter benigno (PINTO JUNIOR *et al.*, 2015), acreditamos que tais fatos justifiquem seus baixos níveis. Corroborando com nossos achados, Weg *et al.* (2014) constatou que níveis elevados de ferritina estavam fortemente associados com a produção de citocinas pró-inflamatórias e gravidade clínica da dengue. Além disso, concluiu que maiores expressões de ferritina estavam associadas a uma intensa ativação imune, fato que também não foi observado em nossos pacientes.

Outra explicação seria os resultados dos doadores saudáveis, uma vez que alguns desses indivíduos apresentaram valores acima dos níveis de referência. Alguns estudos já evidenciaram que certas comorbidades podem ocasionar a elevação da ferritina, como ocorre na síndrome metabólica, desordens hepáticas, doenças auto-imunes e cardiovasculares (SALDANHA, 2009; MACIEL, 2015; CHEN *et al.*, 2016). Não possuímos dados sobre as comorbidades mencionadas, o que pode ser uma das explicações para nossos achados.

Além desses marcadores de fase aguda da infecção, avaliamos os níveis das citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias em infectados pelo ZIKV na fase aguda e convalescente. Esses polipeptídeos sendo utilizados em estudos clínicos por atuar como modificadores da resposta biológica frente à exposição à antígenos, assim os escolhemos para elucidar os mecanismos inflamatórios envolvidos na patogênese da febre Zika (VARELLA; FORTE, 2001).

Nossos resultados das referidas citocinas, quando relacionados os níveis dos indivíduos infectados pelo ZIKV na fase aguda e grupo controle, demonstraram a elevação de IL-5, IL-7 e IL-9. Essas citocinas estão relacionadas a atividade de linfócitos T e por isso, indicam uma possível proliferação desse tipo celular mediante a infecção pelo ZIKV (VARELLA; FORTE, 2001).

A ativação de resposta imune celular mediada por células T é um quadro comum na dengue (PANG; CARSOSA; GUZMAN, 2007) corroborando com nossos achados para o ZIKV, que também é um *Flavivírus*. Entretanto, na dengue ocorre uma ativação imune bem mais expressiva, enquanto que na febre Zika, pelo caráter benigno da doença, não observamos uma grande liberação de citocinas, o que de fato não era esperado (TAPPE *et al.*, 2015).

A IL-5 atua por meio de citotoxicidade celular por linfócitos T CD8⁺ e desempenham um papel crucial na imunidade celular por células T a vírus, enquanto que a IL-7 e IL-9 foram

relacionadas com a proliferação de linfócitos TCD4⁺ (BERRIOS; KURANE; ENNIS, 1996; DOHERTY; SEDER; SHER; 1996; VARELLA; FORTE, 2001; SHAIKH, 2011). Nessa perspectiva, estudos futuros devem ser realizados a fim de verificar quais os tipos de linfócitos ativos na febre Zika, os quais podem ser realizados com marcação com anticorpos monoclonais e citometria de fluxo.

Contraditoriamente aos achados de Tappe *et al.* (2015), nossos resultados do receptor IL-1ra apresentaram-se significativamente elevados ($p < 0,0001$), quando comparado os níveis dos infectados pelo ZIKV e grupo controle. O interessante é que a elevação do IL-1ra pode ser explicada pelo aumento significativo dos níveis de PCR ($p < 0,0001$), uma vez que essa proteína estimula a síntese desse receptor (SANTOS *et al.*, 2003). Dessa forma, o aumento considerável de IL-1ra esclarece os baixos níveis de IL-1 β , uma vez que o IL-1ra é um antagonista que compete com o receptor da IL-1 β , bloqueando as respostas fisiológicas e celulares dessa citocina. Na maioria das pesquisas publicadas, os níveis de IL-1 β são indetectáveis porque o IL-1ra é seu potente inibidor (ZHANG *et al.*, 2007; CIANCIARULLO *et al.*, 2008). Um estudo brasileiro avaliou a produção de IL-1 β mediante cultura com diferentes *Flavivírus* e não constatou nenhuma alteração em sua produção, mesmo diante da estimulação com LPS, Lipopolissacarídeo Bacteriano (BARROS *et al.*, 2009).

Quando comparado os níveis da fase aguda e convalescente, constatou-se achados significativos apenas para a IL-7, que como relatado anteriormente, também apresentou diferença significativa entre a fase aguda e grupo controle. A resposta imune adaptativa por células T relacionada a IL-7 foi avaliada em um estudo *in vitro* com antígenos da dengue (BERRIOS; KURANE; ENNIS, 1996), no qual foram constatados os efeitos dessa citocina na proliferação de linfócitos TCD4⁺, papel crucial na imunidade celular por células T a vírus. Acreditamos que as outras citocinas, como o IL-1ra, podem não ter apresentado valores estatísticos significativos em virtude do n analisado, o que é uma limitação do estudo. Então uma sugestão para futuros estudos seria o aumento do n na fase aguda e convalescente. Entretanto, vale ressaltar, que o acompanhamento e a nova coleta sanguínea é algo complexo, uma vez que já sadios, os pacientes apresentam dificuldades em novamente participar da pesquisa.

A despeito da correlação entre número de sinais e sintomas e níveis das citocinas analisadas, sabe-se que a patogênese de diversas doenças têm sido associada a alterações nos níveis de citocinas inflamatórias e anti-inflamatórias (BOCKOWSKI *et al.*, 2010; OLIVEIRA PINTO *et al.*, 2012; DUARTE *et al.*, 2015). Em nosso trabalho, os resultados não demonstraram uma associação positiva entre essas variáveis, apenas a IL-5 revelou uma

tendência estatística, sendo essa citocina já associada a fisiopatologia da enxaqueca, rinossinusites e gravidade da paracoccidiodomicose e tuberculose (QUAGLIATO JÚNIOR *et al.*, 2007; BOCKOWSKI *et al.*, 2010; ANSELMO-LIMA; SAKANO, 2015).

6 CONCLUSÃO

- O ZIKV se encontrava circulante em Goiânia entre os meses de fevereiro e março de 2016.
- Embora a maioria dos pacientes apresentassem sintomatologia semelhante a infecção pelo ZIKV, a viremia transitória dificultou a detecção do material genético viral e confirmação da doença.
- As principais manifestações clínicas apresentadas pelos infectados pelo ZIKV foram: exantema macupapular pruriginoso, cefaleia, febre de baixa intensidade, mialgia e artralgia.
- Os pacientes infectados pelo ZIKV apresentaram uma discreta manifestação inflamatória e anti-inflamatória na fase aguda, com o aumento de IL-1ra, IL-5, IL-7, IL-9 e PCR. No entanto, quando essas moléculas foram correlacionadas com a quantidade de sinais e sintomas, nenhuma diferença estatística foi observada.
- Na fase aguda e convalescente, apenas a IL-7 apresentou resultados com diferença estatística.

7 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AGUIAR, F. J. B. *et al.* Proteína C reativa: aplicações clínicas e propostas para utilização racional. **Revista da Associação Médica Brasileira**, 59(1): 85-92, 2013.

AL-QAHTANI, A. A. *et al.* Zika virus: a new pandemic threat. **The Journal of Infection in Developing Countries**, 10(3): 201-207, 2016.

ANSELMO-LIMA, W. T.; SAKANO, E. Rhinosinusitis: evidence and experience. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, 81(1):1-49, 2015.

ARAÚJO, J.M.; MOURA, J.S; MARIANO, B.R.A. Impact of high levels of ferritin in human health: A Literature Review. **Revista FACID: Ciência & Vida**, 10(2): 73-83, 2014.

ATKINSON, B. *et al.* Detecção do Zika vírus no sêmen. **Emerging Infectious Diseases journal**, 22(5): 142-144, 2016.

BALM, M. N. D. *et al.* A diagnostic polymerase chain reaction assay for Zika vírus. **Jornal of Medical Virology**, 84(9): 1501-1505, 2012.

BALTIMORE, D. Expression of animal vírus genomes. **Bacteriological Reviews**, 35(3): 235-41, 1971.

BARONTI, C. Complete Coding Sequence of Zika Virus from a French Polynesia Outbreak in 2013. **Genome Announcements**, 2(3): e00500-14, 2014.

BARROS, V. E. D. *et al.* Cytokine and nitric oxide production by mouse macrophages infected with Brazilian flaviviruses. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, 51(3): 141-147, 2009.

BLÁSQUEZ, A-B. Stress responses in flavivirus-infected cells: activation of unfolded protein response and autophagy. **Frontiers in Microbiology**, 266(5): 1-7, 2014.

BOĆKOWSKI, L. *et al.* Anti-inflammatory plasma cytokines in children and adolescents with migraine headaches. **Pharmacological Reports**, 62(2): 287-291, 2010.

BRASIL, P. *et al.* Zika virus outbreak in Rio de Janeiro, Brazil: clinical characterization, epidemiological and virological aspects. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10(4):1-13, 2016.

CAVEIÃO, C. Carta ao editor: Vírus Zika, suas complicações relacionadas à Microcefalia e Guillain-barré. **Cadernos da Escola de Saúde**, 15: (1)3-6, 2016.

CENTERS FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION. Testes de diagnóstico para zika vírus, 2016. Disponível em: <<http://portugues.cdc.gov/zika/hc-providers/types-of-tests.html>>. Acesso em: 07/10/2016.

CHAIYARATANA, W. *et al.* Serum ferritin levels in children with dengue infection. **The Southeast Asian Journal of Tropical Medicine and Public Health**, 39(5): 832-836, 2008.
CHANG, C. *et al.* **The Zika outbreak of the 21st century.** *Journal of Autoimmunity*, 68: 1-13, 2016.

CHEN, L. *et al.* Association of serum ferritin levels with metabolic syndrome and insulin resistance in a Chinese population. **Journal of Diabetes and its Complications**, pii: S1056-8727(16)30221-5, 2016.

CHEN, Na; WANG, Xin. Role of IL-9 and STATs in hematological malignancies (Review). **Oncology Letters**, 7(3): 602-610, 2014.

CHEN, Y-C.; WANG, S-Y. Activation of terminally differentiated human monocytes/macrophages by dengue virus: productive infection, hierarchical production of innate cytokines and chemokines, and the synergistic effect of lipopolysaccharide. **Journal of Virology**, 76(19): 9877-9887, 2002.

CHOW, A. *et al.* Persistent arthralgia induced by Chikungunya virus infection is associated with interleukin-6 and granulocyte macrophage colony-stimulating factor. **Journal of Infectious Diseases**, 203(2): 149-157, 2011.

CIANCIARULLO, M. A. *et al.* Mediadores pró-inflamatórios e anti-inflamatórios na sepse neonatal: associação entre homeostase e evolução clínica. **Revista brasileira de crescimento e desenvolvimento humano**, 18(2): 135-147, 2008.

COES - MICROCEFALIAS Centro De Operações De Emergências Em Saúde Pública Sobre Microcefalias. **Informe Epidemiológico Nº 55– Semana Epidemiológica (Se) 48/2016 (27/11/2016 A 03/12/2016)** 1-5, 2016.

COSTA, S. *et al.* Proteína C reactiva e gravidade da bronquiolite aguda. **Revista Portuguesa de Pneumologia**, 15(1): 55-65, 2009.

CRUZ, A. C. R; VASCONCELOS, P. F. C. Palestra Arbovírus no Brasil. **Biológico**, 70(2): 45-46, 2008.

CUGOLA, F. R. *et al.* The Brazilian Zika virus strain causes birth defects in experimental models. **Nature** 0(1), 2016.

CUNHA, R. V. *et al.* Zika: abordagem clínica na atenção básica, 2016.

CUTOLO, M. IL-1Ra: its role in rheumatoid arthritis. **Reumatismo**, 56 (1s): 41-45, 2004.

DAHER, E. F. Dengue e febre hemorrágica do dengue. **Medicina**, 61(11): 462-470, 2005.

DECKARD, D. T. *et al.* Transmissão sexual homem-homem do Zika vírus. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, 65:372-4, 2016.

DEJNIRATTISAI, W. *et al.* Dengue virus sero-cross-reactivity drives antibody-dependent enhancement of infection with zika vírus. **Nature Immunology**, doi:10.1038/ni.3515, 2016.

DENG, Y.Q. *et al.* Isolation, identification and genomic characterization of the Asian lineage Zika virus imported to China. **Science China Life Sciences**, 59 (4): 428–430, 2016.

DICK, G. W. A.; KITCHEN, A. S.; HADDOW, A. J. Zika virus, Isolations and Serological Specificity. **Transactions of the Royal Society of tropical medicine and hygiene**, 46: (5), 1952.

DODD, J. S. *et al.* IL-9 regulates pathology during primary and memory responses to respiratory syncytial virus infection. **The Journal of Immunology**, 183(11): 7006-7013, 2009.

DOHERTY, T. M.; SEDER, R. A.; SHER, A. Induction and regulation of IL-15 expression in murine macrophages. **The Journal of Immunology**, 156(2): 735-741, 1996.

DUARTE, H. *et al.* Increased interictal serum levels of CXCL8/IL-8 and CCL3/MIP-1 α in migraine. **Neurological Sciences**, 36(2): 203-208, 2015.

DRIGGERS, R. W. *et al.* Zika virus infection with prolonged maternal viremia and fetal brain abnormalities. **New England Journal of Medicine**, 374 (22): 2142-2151, 2016.

DUDLEY, D. M. *et al.* A rhesus macaque model of Asian-lineage Zika virus infection. **Nature Communications**, 7:12204, 2016.

EUROPEAN CENTRE FOR DISEASE PREVENTION AND CONTROL, ECDC. Interim guidance for healthcare providers and Zika virus laboratory diagnosis. Stockholm: ECDC, 2016.

FARIA, R. N. *et al.* Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science**, 352(6283): 345-349, 2016.

FAYE, O. *et al.* Molecular Evolution of Zika Virus during Its Emergence in the 20th Century. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 8(1): 1-10, 2014.

FAYE, O. *et al.* Quantitative real-time PCR detection of Zika virus and evaluation with field-caught Mosquitoes. **Virology Journal**, 10: 311, 2013.

FOY, B. D. *et al.* Probable non-vector-borne transmission of Zika virus, Colorado, USA. **Emerging Infectious Diseases Journal**, 17: 880–882, 2011.

GARCIA, J. B. S.; ISSY, A. M.; SAKATA, R. K. Cytokines and anesthesia. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 52(1): 86-100, 2002.

GALLIEZ, R. M. *et al.* Zika virus causing encephalomyelitis associated with immunoactivation. **Open Forum Infectious Diseases**, 2016.

GUABIRABA, R. *et al.* IL-22 modulates IL-17A production and controls inflammation and tissue damage in experimental dengue infection. **European Journal of Immunology**, 43(6): 1529-1544, 2013.

GUIBARRA ESCOBAR, V. H.; LLIULLI MORANTE, Y. Proteínas de fase aguda. **Revista de Actualización Clínica Investiga**, 13(1): 667-670, 2011.

HAYES, E. B. Zika Virus Outside Africa. **Emerging Infectious Diseases**, 15(9): 1347-1350, 2009.

HERNANDEZ M. E., *et al.* Proinflammatory cytokine levels in fibromyalgia patients are independent of body mass index. **BMC Research Notes**, 3: 156-160, 2010.

KALANTAR-ZADEH, K. *et al.* The fascinating but deceptive ferritin: To measure it or not measure it in chronic kidney disease? **Clinical Journal of the American Society of Nephrology**, 1(1): 9-18, 2006.

KIDD, Parris. Th1/Th2 balance: the hypothesis, its limitations, and implications for health and disease. **Alternative Medicine Review**, 8(3): 223-246, 2003.

KOPF, M. *et al.* Disruption of the murine IL-4 gene blocks Th2 cytokine responses, **Nature**, 362(1): 245-248, 1993.

KOPF, M. *et al.* IL-5-deficient mice have a developmental defect in CD5⁺ B-1 cells and lack eosinophilia but have normal antibody and cytotoxic T cell responses. **Immunity**, 4(1):15-24, 1996.

KRAEMER, M. U. G. *et al.* The global distribution of the arbovirus vectors *Aedes aegypti* and *Ae. albopictus*. **Elife**, 4: e08347, 2015.

KUCHARSKI, A. J. *et al.* Transmission dynamics of Zika virus in island populations: a modelling analysis of the 2013–14 French Polynesia outbreak. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, 10(5): e0004726, 2016.

LAKS, Dani. **Ferritina como marcador de resposta inflamatória sistêmica em crianças criticamente doentes**. 2010. 85 f. Tese (Doutorado em Pediatria e Saúde da Criança) - Faculdade de Medicina, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, 2010.

LIU, J. *et al.* Interleukin-12: an update on its immunological activities, signaling and regulation of gene expression. **Current Immunology Reviews**, 1(2): 119-137, 2005. 2014

LIU, X. *et al.* Iron at the center of ferritin, metal/oxygen homeostasis and novel dietary strategies. **Biological Research**, 39(1): 167-171, 2006.

MACEDO, J. A. *et al.* Adhesion molecules and cytokine expression in fibromyalgia patients: increased L-selectin on monocytes and neutrophils. **Journal of Neuroimmunology**, 188: 156-166, 2007.

MACIEL, C. Proteínas de Fase Aguda. **Humberto Abrão Laboratório**, 2015. Disponível em: < <http://www.humbertoabrao.com.br/wp-content/uploads/2015/02/PROTEINAS-DE-FASE-AGUDA.pdf>>. Acesso em: 26/10/2016.

MANSUY, J. M. *et al.* Zika virus infection and prolonged viremia in whole-blood specimens. **Emerging Infectious Diseases Journal**, 23 (5), 2017.

MARCONDES, C. B.; XIMENES, M. F. F. M. Zika virus in Brazil and the danger of infestation by *Aedes (Stegomyia)* mosquitos. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, 49(1):4-10, 2016.

MAYERI, L. E. *et al.* Perspectivas laboratoriais na avaliação da resposta inflamatória. **Revista Brasileira de Farmácia**, 91(4): 149-61, 2010.

MCCARTHY, M. Zika virus was transmitted by sexual contact in Texas, health officials report. **British Medical Journal**, 352: i720, 2016.

MLAKAR, J. *et al.* Zika Virus Associated with Microcephaly. **The New England Journal of Medicine**, 374: 951-958, 2016.

MUSSO, D.; NILLES, E. J.; CAO-LORMEAU, V.-M. Rapid spread of emerging Zika virus in the Pacific area. **Clinical Microbiology and Infection**, 20 (10): O595-O596, 2014.

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

MUSSO, D. *et al.* Potential Sexual Transmission of Zika Virus. **Emerging Infectious Diseases**, 21: (2) 359-361, 2015b.

NUNES, M. L. *et al.* Microcephaly and Zika virus: a clinical and epidemiological analysis of the current outbreak in Brazil. **Journal of Pediatrics**, 92(3):230-240, 2016.

OEHLER, E. *et al.* Zika virus infection complicated by Guillain-Barré syndrome - case report, French Polynesia, December 2013. **Eurosurveillance**, 19:pii:20720, 2014.

OLIVEIRA, C. M. B. *et al.* Citocinas e dor. **Revista Brasileira de Anestesiologia**, 61(2):260-265, 2011.

PANG, T.; CARDOSA, M. J.; GUZMAN, M. G. Of cascades and perfect storms: the immunopathogenesis of dengue haemorrhagic fever-dengue shock syndrome (DHF/DSS). **Immunology and cell biology**, 85(1): 43-45, 2007.

PETERSEN, L.R. *et al.* Zika Virus. **The New England Journal of Medicine**, 374:1552-1563, 2016.

PINTO JUNIOR, V. L.; LUZ, K.; PARREIRA, R.; FERRINHO, P. Zika Virus: A Review to Clinicians. **Acta Médica Portuguesa**, 28(6):760-765, 2015.

PLOURDE, A. R., BLOCH, E. M. A Literature Review of Zika Virus. **Emerging Infectious Disease Journal**, 22(7), 2016.

PRISANT, N. *et al.* Zika virus in the female genital tract. **The Lancet Infectious Diseases**, 16(9):1000-1001, 2016.

QUAGLIATO JÚNIOR. *et al.* Associação entre paracoccidiodomicose e tuberculose: realidade e erro diagnóstico. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 33(3), 2007.

REIS, R. P. *et al.* Aumento dos casos de microcefalia no Brasil. **Revista Médica de Minas Gerais**, 25(S6): 88-89, 2015.

RODRIGUES, F. S. M.; BOUÇAS, R. I.; ERRANTE, P. R. Clinical and epidemiological aspects and congenital microcephaly correlation by Zika virus infection in Brazil. **Science**, 7(1): 38-49, 2016.

SAIZ, J-C. *et al.* Zika Virus: the Latest Newcomer. **Frontiers in Microbiology**, 7(496): 1-19, 2016.

SALDANHA, V. **Ferritina: intervalos de referência para adultos no estado do Rio Grande do Norte**. 2009. 91f. Dissertação (Mestrado em Ciências Farmacêuticas) – Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Universidade Federal do Rio Grande do Norte, Natal, 2009.

SANTOS, W. B. *et al.* Proteína-C-reativa e doença cardiovascular: as bases da evidência científica. **Arquivos Brasileiros de Cardiologia**, 80(4): 452-456, 2003.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE - MINISTÉRIO DA SAÚDE (SVS-MS). Monitoramento dos casos de microcefalia no Brasil até a Semana Epidemiológica 51/2015. **Boletim Epidemiológico**, 47(1), 2016a.

_____. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 51, 2016. **Boletim Epidemiológico**, 48(2): 1- 10, 2016b.

_____. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 32, 2016. **Boletim Epidemiológico**, 47(33): 1-10, 2016c.

SHAIKH, P. Z. Cytokines & their physiologic and pharmacologic functions in inflammation: A review. **International Journal of Pharmacy & Life Sciences**, 2(11):1247-1263, 2011.

SILVA JÚNIOR, J. L. R. *et al.* Efeito da sazonalidade climática na ocorrência de sintomas respiratórios em uma cidade de clima tropical. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, 37(6): 759-767, 2011.

SILVA, J. S.; MARIANO, Z. F.; SCOPEL, I. A influência do clima urbano na proliferação do mosquito *Aedes aegypti* em Jataí (GO), na perspectiva da Geografia Médica. **Hygeia: Revista Brasileira de Geografia Médica e da Saúde**, 3(5), 2007.

SILVA, D; DE LACERDA, A. P. Proteína C reativa de alta sensibilidade como biomarcador de risco na doença coronária. **Revista Portuguesa de Cardiologia**, 31(11): 733-745, 2012.

SIU, R. *et al.* Acute Zika infection with concurrent onset of guillain-barré syndrome. **Neurology**, 87(1):1623-1624, 2016.

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

SOUZA, Alexandre Wagner Silva *et al.* Tolerância ou auto-imunidade? O delicado equilíbrio do sistema imunológico, s.d.

TANG, H. *et al.* Zika Virus Infects Human Cortical Neural Progenitors and Attenuates Their Growth. **Cell Stem Cell**, 18(5): 587–590.

TAPPE, L. D. *et al.* Cytokine kinetics of Zika virus-infected patients from acute to convalescent phase. **Acta Médica Portuguesa**, 205(3):269-73, 2015.

THEIL, E. C. Ferritin: At the Crossroads of Iron and Oxygen Metabolism. **The Journal of Nutrition**, 133(5): 1549S-1553S, 2003.

TONELI, M. J. F.; SOUZA, M. G. C.; MULLER, R. C. F. 973 Masculinidades e práticas de saúde: retratos da experiência de pesquisa em. **Physis Revista de Saúde Coletiva**, 20(3): 973-994, 2010.

VALLE, D., PIMENTA, D. N., AGUIAR, R. Zika, dengue e chikungunya: desafios e questões. **Epidemiologia e Serviços de Saúde**, 25(2):419-422, 2016.

VARELLA, P. P. V.; W. C. N., Forte. Citocinas: revisão. **Revista Brasileira de Alergia e Imunopatologia**, 24(1): 146-154, 2001.

VERRI, W. A. J. **Study on the Relation and Mechanisms involved in the Mechanical Hypernociception and Neutrophil Migration Induced by IL-15**. 2006. 183p. Tese – Departamento de Farmacologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, SP, 2006.

VIRAL ZONE. Ilustração da partícula viral do vírus Zika. **Swiss Institute of Bioinformatics**, 2011. Disponível em:< <http://viralzone.expasy.org/>>. Data de acesso: 17/09/2016.

VOLP, A. C. P. *et al.* Capacidade dos biomarcadores inflamatórios em prever a síndrome metabólica: Inflammation biomarkers capacity in predicting the metabolic syndrome. **Arquivos Brasileiros de Endocrinologia & Metabologia**, 52(3): 537-549, 2008.

WALLACE, D. J. Cytokines play a aetiopathogenetic role in fibromyalgia: a hypothesis and pilot study. **Rheumatology**, 40: 743-749, 2001.

WALLACE, D. J. Is there a role for cytokine based therapies in fibromyalgia. **Current Pharmaceutical Design**, 12: 17-22, 2006.

WINKLER, Clayton W. *et al.* Adaptive Immune Responses to Zika Virus Are Important for Controlling Virus Infection and Preventing Infection in Brain and Testes. **The Journal of Immunology**, 2017.

WINTER, P. M. *et al.* Proinflammatory cytokines and chemokines in humans with Japanese encephalitis. **Journal of Infectious Diseases**, 190(9): 1618-1626, 2004.

WHO/CDC/ICBDSR. Birth defects surveillance: a manual for programme managers. Geneva: World Health Organization; 2014.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Zika situation report, 2016a. Disponível em: <<http://www.who.int/emergencies/zika-virus/situation-report/14-july-2016/en/>>. Data de acesso: 19/07/2016.

_____. WHO statement on the first meeting of the International Health Regulations (2005) (IHR 2005) Emergency Committee on Zika virus and observed increase in neurological disorders and neonatal malformations. 2016b. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/news/statements/2016/1st-emergency-committee-zika/en/>. Acesso em: 14/10/2016.

_____. Doença do vírus Zika, 2016c. Disponível em: <<http://www.who.int/mediacentre/factsheets/zika/pt/>>. Data de acesso: 04/07/2016.

ZANLUCA, C. *et al.* First report of autochthonous transmission of Zika virus in Brazil. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, 110(4): 569-72, 2015.

ZHANG, J-M; JIANXIONG, A. N. Cytokines, inflammation and pain. **International Anesthesiology Clinics**, 45(2):27-37, 2007.

A elaboração das referências bibliográficas estão de acordo com Associação Brasileira de Normas Técnicas, 2002b, ABNT NBR 6023.

APÊNDICE I - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE GOIÁS
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA



MESTRADO EM CIÊNCIAS
AMBIENTAIS E SAÚDE

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você está sendo convidado (a) para participar, como voluntário, em uma pesquisa. Meu nome é Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, sou a pesquisadora responsável pelo projeto e minha área de atuação é Imunologia de doenças infecciosas. Após ler com atenção este documento e ser esclarecido (a) sobre as informações a seguir, no caso de aceitar fazer parte do estudo, **assine em todas as folhas e ao final deste documento**, que está em duas vias e também será assinado por mim, pesquisadora, em todas as folhas. Uma delas é sua e a outra é do pesquisador responsável. Em caso de dúvida sobre a pesquisa, você poderá entrar em contato com o pesquisador responsável, Dra Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, no telefone: (62) 3946-1346. Em caso de dúvidas sobre os seus direitos como participante nesta pesquisa, você poderá entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás pelo telefone (62) 3946-1071.

INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA

Título do Projeto: *“Perfil da expressão gênica em amostras de sangue de indivíduos infectados pelo vírus Zika nas fases aguda e de convalescença”.*

O vírus Zika (ZIKV) é transmitido principalmente pela picada de mosquitos Aedes, e somente 20% dos indivíduos infectados com o vírus apresentarão sintomas da doença. Além disso, existe apenas um tipo de vírus circulante, mas que pode apresentar alterações em sua estrutura de acordo com a região em que se desenvolve.

Em geral, os casos que apresentam sintomas exibem um quadro semelhante ao da Dengue e Chikungunya, com as seguintes sintomatologias: febre, dor de cabeça, dor articular e muscular, e manchas vermelhas espalhadas pelo corpo.

Nesse projeto pretendemos realizar um estudo capaz de identificar quais as alterações no sistema imune que podem ser ocasionadas pela presença do Zika Vírus e detectar qual o tipo de vírus que o indivíduo com Zika está infectado, bem como se existe alterações na estrutura do vírus que circula no Brasil.

Assim, nossa hipótese é que há a alteração no sistema imune de indivíduos que estão infectados com o Zika vírus e que o vírus circulante no Brasil não apresenta muitas alterações em sua estrutura.

Acreditamos que a identificação das alterações no sistema imune e da estrutura viral, será útil para tratar o paciente, estratégias de controle de mosquitos e diferenciar de outras doenças também causadas pela picada de insetos.

Objetivos da pesquisa: Detectar a infecção pelo Vírus Zika em indivíduos com suspeita da doença; Quantificar o vírus Zika nos indivíduos infectados; Determinar características do sistema imune em infectados com o ZIKV e estrutura viral do mesmo.

Duração do estudo: Esse estudo está previsto para durar 2 anos. A sua participação nessa pesquisa será o tempo gasto no momento da coleta de sangue e coleta de informações para o preenchimento da ficha de investigação, com duração de 15 a 20 minutos.

Procedimentos a serem seguidos durante o estudo: Será preenchida uma ficha de investigação e, se for necessário, seu prontuário médico também poderá ser observado, para que os resultados de todos os exames que você já realizou sejam avaliados pelos pesquisadores. Serão colhidos 10 mL de sangue de sua veia para realização de testes que avaliarão se você está com o Zika Vírus, quanto de vírus há em seu organismo, para que possamos compreender como o vírus age e como pode ser combatido.

Desconfortos e riscos potenciais: Esta pesquisa por necessitar da obtenção de amostras de sangue, é considerada de risco médio, porque gera desconforto, dor durante a coleta, formação de manchas roxas no local da coleta de sangue e, ainda, tonturas. Para minimizar tais problemas, será utilizada nesta pesquisa, sala reservada para entrevista e coleta de amostra; o profissional que realizará a coleta de sangue é muito experiente e trabalha somente com coleta de sangue; todo o procedimento antes e após a coleta seguirá os padrões de segurança e Boas Práticas Laboratoriais.

Benefícios que poderão ser obtidos: Você receberá resultados de exames laboratoriais (PCR para Zika e Chikungunya) sem qualquer custo. Também será orientado quanto ao curso e desenvolvimento da doença, será aconselhado sobre como proceder após o recebimento dos resultados. Sua participação beneficiará outras pessoas por promover melhor entendimento de fatores relacionados com a origem, ao curso do Zika Vírus e reações no organismo, tratamento e desenvolvimento de vacinas, bem como cuidados relacionados ao combate do mosquito.

Compensações e custos: Todas as consultas, procedimentos e testes laboratoriais feitos especificamente para este estudo serão fornecidos a você sem nenhum custo. A equipe

pesquisadora se dispõe em oferecer a você assistência integral e gratuita por danos diretos e indiretos, imediatos ou tardios em função da sua participação no estudo, afim de minimizar os transtornos causados

Descontinuação do Estudo: Você poderá deixar de participar deste estudo ou retirar seu consentimento a qualquer momento que achar necessário sem prejuízos em seu atendimento hospitalar e sem nenhum dano moral, ético, social, financeiro, etc.

Esclarecimentos dados sobre garantias do participante da pesquisa:

- ✓ Você terá a garantia, a qualquer tempo de que receberá as informações sobre os procedimentos, riscos e benefícios relacionados à pesquisa, inclusive sobre o esclarecimento de qualquer dúvida;
- ✓ Você tem liberdade para se recusar a participar ou retirar seu consentimento e descontinuar sua participação a qualquer tempo. A participação é voluntária e a recusa em participar não envolverá nenhuma penalidade ou perda de benefícios. Recusa ou descontinuação não irão de nenhuma forma colocar em risco seu direito de receber tratamento.
- ✓ Seu médico e os demais investigadores desse estudo tratarão sua identidade com padrões profissionais de confidencialidade. Seus registros permanecerão confidenciais. Nomes de participantes ou materiais identificando participantes não serão publicados. Os participantes não serão identificados em nenhuma publicação que possa resultar deste estudo. Uma cópia deste consentimento ficará com esta equipe de pesquisa e uma será dada a você.
- ✓ Todos os procedimentos e consultas deste estudo lhe serão fornecidos sem nenhum custo. Assistência médica por danos causados direta e indiretamente relacionados com este estudo serão de responsabilidade desta equipe pesquisadora.

Eu, _____, RG/ CPF/ nº de prontuário/ nº de matrícula _____, abaixo assinado, concordo em participar do estudo "*Perfil da expressão gênica em amostras de sangue de indivíduos infectados pelo vírus zika nas fases aguda e de convalescença*", sob a responsabilidade da Dr^a. Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer, como sujeito voluntário. Fui devidamente informado e esclarecido pela pesquisadora Irmtraut Araci Hoffmann Pfrimer sobre a pesquisa, os procedimentos nela envolvidos, assim como os possíveis riscos e benefícios decorrentes de minha participação.

Foi me garantido que posso retirar meu consentimento a qualquer momento, sem que isto leve a qualquer penalidade.

Local e data: _____

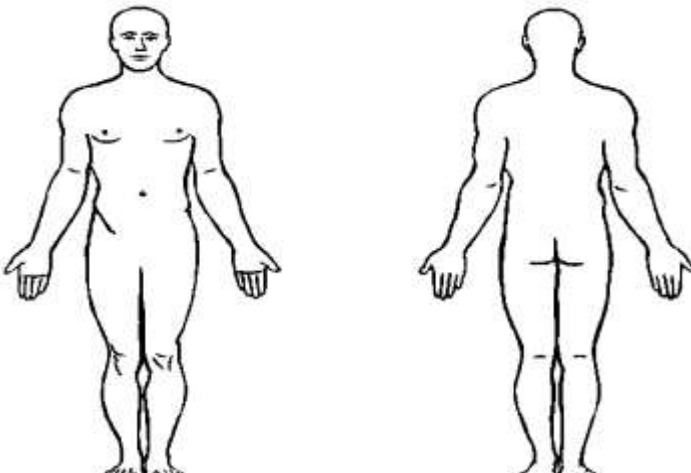
Nome e Assinatura do Participante: _____

Assinatura Dactiloscópica:

Nome e assinatura do Pesquisador Responsável: _____

APÊNDICE II – QUESTIONÁRIO

N. ____

DADOS GERAIS	Nome:	
	Município:	UF:
	Unidade de saúde:	Data do início dos sintomas: ____/____/____
	Telefone:	Sexo: <input type="checkbox"/> M <input type="checkbox"/> F <input type="checkbox"/> Ignorado
	Se Gestante: <input type="checkbox"/> 1º Trim. <input type="checkbox"/> 2º Trim. <input type="checkbox"/> 3º Trim.	Viagem anterior a 30 dias:
	Escolaridade:	Ida ____/____/____ Volta ____/____/____ Local:
	Nome do Responsável legal:	
Zona de Residência: <input type="checkbox"/> Urbana <input type="checkbox"/> Periurbana <input type="checkbox"/> Rural <input type="checkbox"/> Ignorado		
DADOS CLÍNICOS-LABORATORIAIS	Exame para dengue: <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	
	Exame para Malária: <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	
	Exame para Mayaro: <input type="checkbox"/> Positivo <input type="checkbox"/> Negativo	
	Exames adicionais:	
	Antecedentes prévios de comorbidade: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim ()	
	Apresentação clínica: <input type="checkbox"/> Aguda(até 7 dias) <input type="checkbox"/> Subaguda (até 3 meses) <input type="checkbox"/> Crônica (+3 meses)	
	Hospitalização: <input type="checkbox"/> Não <input type="checkbox"/> Sim (Data Internação: ____/____/____ Alta: ____/____/____)	
	Sinais e sintomas:	
	<input type="checkbox"/> Febre <input type="checkbox"/> Artralgia intensa <input type="checkbox"/> Cefaléia <input type="checkbox"/> Náuseas <input type="checkbox"/> Diarréia <input type="checkbox"/> Vômitos <input type="checkbox"/> Exantema <input type="checkbox"/> Mialgia <input type="checkbox"/> Zumbidos no ouvido <input type="checkbox"/> Tonturas <input type="checkbox"/> Edema (identificar o local): <input type="checkbox"/> Mãos <input type="checkbox"/> Punhos <input type="checkbox"/> Joelhos <input type="checkbox"/> Tornozelos <input type="checkbox"/> Pés <input type="checkbox"/> Gânglios enfiados <input type="checkbox"/> Hiperemia conjutival <input type="checkbox"/> Dor nas costas <input type="checkbox"/> Outro ()	
<p>OBS: Marcar na figura abaixo as articulações afetadas, de acordo com o seguinte: <u>D</u>: dor; <u>E</u>: edema; <u>Ar</u>: Derrame articular; <u>V</u>: vermelhidão (uma mesma articulação pode ser marcada com mais de uma letra).</p>		
		

ANEXO

Saúde
 Ministério da Saúde

Plataforma Brasil

Público Pesquisador Meus Dados

Imrat Azei Hoffmann Primer - Pesquisador | 132
 Sua sessão expira em: 25min 05s

DETALHAR PROJETO DE PESQUISA

- DADOS DA VERSÃO DO PROJETO DE PESQUISA

Título de Pesquisa: AVALIAÇÃO DE ASPECTOS OPERACIONAIS DA SELEÇÃO E DE CONVALÊNCIA EM PACIENTES INFECTADOS PELO ZIKA VIRUS
 Pesquisador Responsável: Imrat Azei Hoffmann Primer
 Área Temática:
 Versão: 1
 CAAE: ST00716.9.0003.0037
 Submetido em: 08/07/2016
 Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Goiás - PUC Goiás
 Situação da Versão do Projeto: Aprovado
 Localização atual da Versão do Projeto: Pesquisador Responsável
 Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

Componente de Pesquisa: PQ_COMPROVANTE_RECEBIDO_706329