UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO

ANA BEATRIZ DOS ANJOS SOUZA

**Estudo sobre infectividade dos vírus Chikungunya e
Mayaro em hemocomponentes**

Ribeirão Preto, SP

2020

ANA BEATRIZ DOS ANJOS SOUZA

**Estudo sobre infectividade dos vírus Chikungunya e
Mayaro em hemocomponentes**

Versão Corrigida

Dissertação de Mestrado a ser apresentada ao curso de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, para a obtenção do título de Mestre (a) em Ciências

Orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Ribeirão Preto, SP

2020

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL
DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU
ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO DE PESQUISA, DESDE QUE CITADA A
FONTE.

Catálogo na Publicação

Serviço de Documentação

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Souza, Ana Beatriz dos Anjos

Estudo sobre infectividade dos vírus Chikungunya e Mayaro em hemocomponentes / Ana Beatriz dos Anjos Souza; orientador: Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo - Ribeirão Preto, 2020.

83p.: il. ; 30 cm

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo. Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica – Investigação Biomédica, 2020.

1.Arbovírus 2.*Alphavirus* Mayaro 3. *Alphavirus* Chikungunya
4.Hemocomponentes 5.Viremia

FOLHA DE APROVAÇÃO

Nome: Ana Beatriz dos Anjos Souza

Título: Estudo sobre a infectividade dos vírus Chikungunya e Mayaro em hemocomponentes

Dissertação de Mestrado apresentada à Faculdade de
Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo.
Programa de Pós-Graduação em Clínica Médica –
Investigação Biomédica.

Apresentada em 29/10/2020

Banca Examinadora

Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. Victor Hugo Aquino Quintana

Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo

Prof. Dr. José Eduardo Levi

Instituto de Medicina Tropical de São Paulo da Universidade de São Paulo

Dedico este trabalho aos meus pais, João Dias e Ozete Oliveira e aos meus irmãos Ricardo e Eduardo, pelo apoio e amor incondicional em todos os momentos.

AGRADECIMENTOS

A Deus e a virgem Maria por estarem sempre ao meu lado me protegendo e abençoando guiando minha vida, fazendo-me perseverante na busca de meus objetivos pessoais.

Ao Prof. Dr. Luiz Tadeu Moraes Figueiredo, por acreditar em meu potencial e permitir o desenvolvimento deste trabalho. Pelo investimento do seu tempo, orientação, confiança e principalmente oportunidade. Minha admiração e gratidão.

Aos funcionários e ex- funcionários do Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos-SP, em especial ao César primeiro incentivador, obrigada por tudo. À coordenadora Ariane e Dra. Fernanda, por permitirem e não medirem esforços, e aos demais funcionários, por terem contribuído assiduamente para a realização deste trabalho.

Aos membros da banca examinadora, por fazerem parte do julgamento deste trabalho.

Aos colegas e amigos de laboratório, por todas as indagações que foram essenciais para eu visualizar a riqueza do projeto que tinha em mãos. Em especial a Victória, pelas inseguranças compartilhadas, pelo incentivo, carinho e suporte espiritual. Ao Danilo, que com toda sua paciência e conhecimento me ajudou em inúmeros momentos, ao Leonardo pelas nossas trocas, ajuda com as análises estatísticas e carinho. E aos demais que puderam compartilhar de novas ideias, experiência, risadas e trocas: Angélica, Marcílio, Rafael, Larissa, Felipe e Carla.

A funcionária Soraya pelo apoio experimental, nos ensinamentos de cultura de célula e pelo carinho e paciência que sempre demonstra por todos do laboratório.

Ao colega William, obrigada pelas discussões e trocas que foram fundamentais para enriquecimento do trabalho.

Aos professores do Centro de Pesquisa em Virologia: Dr. Eurico Arruda, Dr. Benedito Fonseca e Dr. Luiz Lamberti.

Aos funcionários do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP, Adriana, Maria Lúcia, Danilo, Andréia, Sueli e Leila.

Aos professores e funcionários do programa de Pós-graduação em Clínica Médica da FMRP-USP, ao Emerson, secretário do programa, pela gentileza e presteza.

À Marília e Aline, obrigada pela amizade, mesmo não fazendo mais parte do laboratório me acolheram, obrigada pelo carinho.

Aos colegas do Centro de Pesquisa em Virologia, pois cada um da sua maneira e com seu carinho me acolheram e contribuíram para que este trabalho fosse realizado. Em especial à Luiza, que com toda sua delicadeza, paciência e conhecimento não mediu esforços para esclarecer minhas dúvidas.

Aos amigos do “bandex”, obrigada pelos nossos almoços, ceia, risadas, afetos, carinho, conversas maduras e imaturas rs, com certeza o melhor momento do dia são nossos almoços e trocas, vocês foram combustível e dose de alegria diária na minha vida acadêmica. Muito obrigada.

Aos meus queridos amigos Danilo, Bruna, Juliano, Rosa e Cristina que ressignificaram o título de colegas de trabalho para emergirem como amigos de conversas, jantares e discussões sobre a vida. Os momentos com vocês foram essenciais.

Aos meus amigos da vida que estão espalhados e guardados no meu coração, em especial à Aline, Beatriz, Ingrid, Eloá, Camila (Edu), Maiara, Anna (AnnaLu), Genoveva (Gui), é uma satisfação sem fim compartilhar de tantos momentos incríveis na presença de vocês. Obrigada por compreenderem minha ausência e por serem exatamente o que são: especiais em suas singularidades e essenciais na minha vida.

Aos meus afilhados Iago e Stefani, mesmo tão pequenos, compreenderam minha ausência, e sempre me receberam com sorrisos, chamegos e carinho.

E, por último, mas sem dúvida alguma, as pessoas mais importantes disso tudo: meus pais, João e Ozete a base recebida ao longo da vida, pelo exemplo de RESISTÊNCIA, determinação, luta, dignidade, amor e união. Aos meus irmãos, Ricardo e Eduardo, por serem meus amigos, companheiros e pela lealdade de sempre. Nossos laços nos fazem fortes por toda vida, todos esforços que vocês tiveram para chegar aonde chegamos só faz meu amor e gratidão por vocês ser maior ainda, é por vocês.

Ao CNPQ pelo apoio financeiro e bolsa concedida (processo 134303/2018-0)

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP) pelo apoio financeiro a este estudo processador (processo 2014/02438-6).

A Capes pelo apoio financeiro a este estudo.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente, e ainda que não citados, tiveram papel importantíssimo na realização deste trabalho: meu sincero agradecimento.

RESUMO

SOUZA, A. B. A. **Estudo sobre infectividade dos vírus Chikungunya e Mayaro em hemocomponentes.** 2020-83f. Dissertação de Mestrado. Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Os arbovírus são responsáveis por doenças, esporádicas ou em epidemias, que podem ser graves ou debilitantes, com impacto significativo para a saúde humana no Brasil e no mundo, tornando importante o estudo de suas transmissibilidades por transfusão sanguínea. Dentre os arbovírus, os *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro, apesar de não serem altamente letais, após produzirem doenças febris agudas, podem ser causadores de doenças articulares dolorosas e incapacitantes que perduraram por meses ou anos. No presente estudo, objetivou-se avaliar a infectividade dos *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro em produtos do sangue nas unidades formadoras de *plaques* (PFU/mL) e por qPCR em número de cópias de RNA viral equivalente a PFU. Também pesquisou-se a infecção por *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro em leucócitos, como linfócitos B, linfócitos T, monócitos e macrófagos do sangue periférico. Ainda, avaliou-se a infectividade dos dois vírus em linhagens de linfócitos T CD4⁺ (A30-1), de monócitos (THP-1) e de megacariócitos (MEG-1). Os resultados obtidos mostram que bolsas de sangue doado inoculadas com vírus Mayaro ou vírus Chikungunya, mantêm ambos os vírus infectantes durante o processamento dos hemoderivados (concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas e plasma fresco congelado) e mesmo após o armazenamento específico recomendado para cada produto, sendo capazes de infectar indivíduos com eles transfundidos. Observou-se que o Mayaro e o Chikungunya infectam linfócitos B (CD19⁺ CD20⁺), linfócitos T (CD3⁺ e CD4⁺) e ainda, o Mayaro infecta monócitos (CD14⁺) e o Chikungunya infecta macrófagos (CD68⁺) do sangue periférico, podendo ser disseminados nos pacientes por estas células. Também o vírus Mayaro e o Chikungunya infectam culturas de linfócitos TCD4⁺, megacariócitos e monócitos humanos, produzindo relevantes replicações virais que têm possíveis repercussões na fisiopatologia das doenças por estes vírus. Os resultados deste trabalho evidenciam que, para prevenir infecções por vírus Mayaro e por vírus Chikungunya em hemoderivados, faz-se necessário estimular o desenvolvimento e a utilização de testes diagnósticos para estes patógenos no sangue doado.

Palavras Chaves: Arbovírus, *Alphavirus* Mayaro, *Alphavirus* Chikungunya, Hemocomponentes, Viremia.

ABSTRACT

SOUZA, A. B. A. Study on the infectivity of Chikungunya and Mayaro virus in blood components. 2020-83f. Thesis. Ribeirão Preto School of Medicine - University of São Paulo, Ribeirão Preto, 2020.

Arboviruses are responsible for diseases, sporadic or in epidemics, which can be serious or debilitating with a significant impact on human health in Brazil and worldwide making it important to study their transmissibilities through blood transfusion. Among the arboviruses, the Alphaviruses Chikungunya and Mayaro, although not highly lethal, after producing acute febrile illnesses can cause painful and disabling joint diseases that lasted for months or years. In the present study the objective was to evaluate the infectivity of Alphavirus Chikungunya and Mayaro in blood products in plaque forming units (PFU / mL) and by qPCR in number of copies of PFU-equivalent viral RNA. Alphavirus Chikungunya and Mayaro infection was also investigated in leukocytes, such as B lymphocytes, T lymphocytes, monocytes and macrophages of peripheral blood. In addition, the infectivity of the two viruses in CD4 + T lymphocyte (A30-1), monocyte (THP-1) and megakaryocyte (MEG-1) lines was evaluated. The results obtained show that donated blood bags inoculated with Mayaro virus or Chikungunya virus keep both infecting viruses during the processing of blood products (red blood cell concentrate, platelet concentrate and fresh frozen plasma) and even after the specific storage recommended for each product, being able to infect individuals transfused with them. It was observed that Mayaro and Chikungunya infect B lymphocytes (CD19 + CD20 +), T lymphocytes (CD3 + and CD4 +) and Mayaro infects monocytes (CD14 +) and Chikungunya infects peripheral blood macrophages (CD68 +), which can be disseminated in patients by those cells. Mayaro virus and Chikungunya also infect cultures of TCD4 + lymphocytes, megakaryocytes and human monocytes, producing relevant viral replications that have possible repercussions on the pathophysiology of diseases caused by these viruses. The results of this work show that to prevent infections by Mayaro virus and Chikungunya virus in blood products, it is necessary to stimulate the development and use of diagnostic tests for these pathogens in donated blood.

Keywords: Arbovirus, Alphavirus Mayaro, Alphavirus Chikungunya, Hemocomponents, Viremia

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura1: Ciclos de transmissão de arbovírus..	15
Figura 2: Representação da estrutura dos Alphavirus.	16
Figura 3: Ciclo replicativo dos Alphavirus..	18
Figura 4: Análise temporal dos títulos de MAYV e CHIKV, em PFU/mL, infectando concentrados de plaquetas oriundos de bolsas de sangue infectadas por 12h e por 24h.	39
Figura 5: Análise temporal dos títulos de MAYV e CHIKV, em PFU/mL, infectando concentrados de hemácias oriundas de bolsas de sangue infectadas por 12h e por 24h.	40
Figura 6: Análise temporal dos títulos de MAYV e CHIKV em PFU/ml, infectando plasmas frescos congelados oriundos de bolsas de sangue infectadas por 12h e por 24h.	41
Figura 7: Quantificação dos genomas de MAYV e CHIKV por qRT-PCR, em número de cópias de RNA viral equivalente a PFU, em concentrados de plaquetas, segundo diferentes tempos iniciais de infecção viral.	41
Figura 8: Quantificação dos genomas de MAYV e CHIKV por qRT-PCR, em número de cópias de RNA viral equivalente a PFU nos concentrados de hemácias segundo diferentes tempos iniciais de infecção viral.	42
Figura 9: Quantificação dos genomas de MAYV e CHIKV por qRT-PCR, em cópias de RNA viral equivalente a PFU, nos plasmas, segundo diferentes tempos iniciais de infecção viral.	42
Figura10: Imunofluorescência indireta de PBMC realizada 24 horas após inoculação com os vírus Chikungunya e Mayaro.	43
Figura 11: Imunofluorescência indireta de diferentes fenótipos de PBMC inoculados com CHIKV e MAYV.	44
Figura 12: Imunofluorescência indireta de PMN do sangue periférico de voluntários saudáveis inoculados in vitro com CHIKV e MAYV.	45
Figura 13: Teores de CHIKV e MAYV (em PFU/ml), infectando linhagens de linfócitos TCD4 ⁺ A30-1, de megacariócitos MEG-1 e de monócitos THP-1, com base em amostras, coletadas de sobrenadante.	47

Figura 14: Quantificação do genoma viral nos linfócitos TCD4⁺ (linhagem A30-1), megacariócitos (linhagem MEG-1) e monócitos (linhagem THP-1) após infecção in vitro com MOI 1 do CHIKV ou MAYV..... 49

Figura 15: Imunofluorescência indireta de linfócitos TCD4⁺ (linhagem A30-1), megacariócitos (linhagem MEG-1) e monócitos (linhagem THP-1) após infecção in vitro com MOI 1 de CHIKV ou MAYV. 50

LISTA DE TABELAS

Tabela1: Primers para RT-PCR de Chikungunya, na região codificadora da proteína do capsídeo. 32

Tabela 2:Primers para RT-PCR de Mayaro, na região codificadora de NS1. ... 32

Tabela 3: Temperaturas de armazenamento e períodos de conservação dos hemocomponentes. 35

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

ATCC-	American Type Culture Collection
A30-1-	Linhagem de linfócito TCD4+
ABHH-	Associação Brasileira de Hematologia e Hemoteria
BSA-	Albumina de soro bovino (<i>Bovine Serum Albumin</i>)
cDNA-	DNA complementar
C-	Proteína do Capsídeo
CD4-	<i>Cluster of differentiation 4</i> (linfócito T CD4+)
CD8-	Cluster of differentiation 8 (linfócito T CD8+)
CD14-	<i>Cluster of differentiation 14</i> (monócito)
CD19-	<i>Cluster of differentiation 19</i> (linfócito B)
CD20-	<i>Cluster of differentiation 20</i> (linfócito B)
CD68-	<i>Cluster of differentiation 68</i> (macrofágo)
CH-	Concentrado de Hemácia
CHIKV-	Vírus Chikungunya
CMC-	Carboximetilcelulose
CP-	Concentrado de Plaquetas
CPE-	Efeito citopático
CPV-	Centro de Pesquisa em Virologia
DENV 1-	Vírus Dengue sorotipo 1
DENV 2-	Vírus Dengue sorotipo 2
DENV 3-	Vírus Dengue sorotipo 3
DENV 4-	Vírus Dengue sorotipo 4
DMSO-	Dimetilsulfóxido
DNA-	Ácido Desoxirribonucleico
E1-	Proteína Estrutural 1
E1, E2, E3-	Proteína Estrutural 1, 2 e 3
EEEV-	Vírus da Encefalite Equina do Leste
FAPESP-	Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo
FMRP-	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
HBsAg-	Antígeno de superfície do vírus da hepatite B
HCV-	Vírus da Hepatite C
HIV-	Vírus da Imunodeficiência humana
HTLV-	Vírus linfotróficos T humanos
IFA-	Imunofluorescência indireta
IgG-	Imunoglobulina G (anticorpo)
IgM-	Imunoglobulina M (anticorpo)
MOI-	Multiplicity of infection
MAYV-	Vírus Mayaro
MEG-1-	Linhagem de Megacariócito
MEM-	Meio Essencial Mínimo
mRNA-	Ácido nucleico mensageiro
Anti – HBc	Anticorpo anti- vírus hepatite B

NAT-	Teste de Ácido Nucléico
NSP1, 2, 3,4-	Proteínas não estruturais 1, 2, 3 e 4
ONNV-	Vírus Ony Onyg Ony Onyg
ORF-	<i>Open reading frame</i>
PCR-	Reação em cadeia da Polimerase
PBMC-	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Mononuclear Cells</i>)
PBS-	Tampão fosfato salino (<i>phosphate buffered saline</i>)
PFC-	Plasma Fresco Congelado
PFU/mL-	Unidade formadora de Plaque por mili litros
PMN-	Células mononucleares do sangue periférico (<i>Peripheral Blood Neutrophils Cells</i>)
RDC-	Resolução da Diretoria Colegiada da Agência Nacional de Vigilância Sanitária
RNA-	Ácido Ribonucléico
RPMI-	Roswell Park Memorial Institute
RRV-	Vírus Ross River
RT-PCR-	Reação em cadeia da Polimerase procedida de Transcrição Reversa
SFB-	Soro Fetal Bovino
SFV-	Vírus Semlink Forest
SINV-	Vírus Sindbis
ST-	Sangue Total
SP-	Estado de São Paulo
USP-	Universidade de São Paulo
T.A-	Temperatura ambiente
TCLE-	Termo Consentimento Livre e Esclarecido
THP-1-	Linhagem de monócito
VDRL-	Venereal Disease Research Laboratory (sífilis)
VEEV-	Vírus da Encefalite Equina Venezuelana
WEEV-	Vírus da Encenfalite Equina do Oeste
WNV-	Vírus do Oeste do Nilo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	14
1.1 Arbovírus	14
1.2 Gênero Alphavirus	15
1.2.1 Vírus Mayaro (MAYV)	18
1.2.2 Vírus Chikungunya (CHIKV)	19
1.3 Arboviroses e Transfusão Sanguínea	20
2. JUSTIFICATIVA	25
3. OBJETIVOS	27
3.1. Objetivo Geral	27
3.2. Objetivos Específicos	27
4. MATERIAL E MÉTODOS	29
4.1 Preparação dos Estoques virais	29
4.2. Teste de Imunofluorescência Indireta	30
4.3. Técnica para a RT-PCR	31
4.3.1. Extração do RNA	31
4.3.2. RT-PCR em tempo real para Chikungunya e Mayaro	31
4.4. Quantificação dos estoques virais	32
4.5. Obtenção e processamento de bolsas de sangue	33
4.6. Infecção das bolsas de sangue	33
4.7. Separação de células mononucleares e neutrófilos humanos do sangue periférico	35
4.8 Cinética de replicação do MAYV e do CHIKV nas linhagens de Linfócitos (A30-1), Monócitos (THP-1) e Megacariócitos (MEG-1)	37
5. RESULTADOS	39
6. DISCUSSÃO	53
7. CONCLUSÃO	62
8. REFERÊNCIAS	64
ANEXOS	75

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

1.1 Arbovírus

Arbovírus, do inglês “*arthropod borne virus*”, são vírus mantidos na natureza em ciclos silvestres que possuem como vetores artrópodes hematófagos (PINHEIRO, 1982; FIGUEIREDO, 1994; VASCONCELOS et al., 1992). Esses arbovírus são transmitidos pela picada dos insetos infectados em hospedeiros vertebrados e, eventualmente, podem infectar seres humanos e animais domésticos que circulam em locais próximos às áreas silvestres, levando ao desenvolvimento de doenças (**Figura 1.**) (BLANCOU et al., 2005; HUBALEK; RUDOLF, 2012 WOODALL, 1987). Outras formas de transmissão das arboviroses pouco abordadas, mas de grande importância no âmbito das transmissões humanas, incluem transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transfusão perinatal e infecções acidentais em laboratório.

Os arbovírus incluem vírus pertencentes às famílias *Flaviviridae*, *Togaviridae*, *Peribunyaviridae*, *Rhabdoviridae*, *Reoviridae*, *Asfaviridae*, *Orthomyxoviridae* e *Phenuiviridae* (CHRISTOU, 2011; HUBALEK, 2012; ICTV, 2019; BLANCOU et al, 2005; JONES et al, 2008; MESLIN, 1997, WEAVER et al, 2010). Ressaltamos aqui os *Togaviridae* do gênero *Alphavirus*, que causam uma ampla gama de doenças em seres humanos e em animais.

O Brasil, por ser um país tropical, apresenta grande diversidade de fauna e flora, possuindo condições ideais para a manutenção, emergência e/ou reemergência de arbovírus. Tais características, associadas à crescente degradação ambiental, contribuem para a aproximação dos vetores de arboviroses com os seres humanos (FIGUEIREDO, 2000; ROMANO-LIEBER, 2000; VASCONCELOS, P. F. C., LIMA, 2016; SABINO-Jr, 2018). Um exemplo desta aproximação dá-se com mosquitos do gênero *Culex* e *Aedes* que adaptaram-se ao ambiente urbano, sendo vetores importantes de outras arboviroses como a Dengue, West Nile, Febre Amarela e Zika (FIGUEIREDO, 2007; FARIA et al., 2016). Ciclos de arbovírus são representados na **Figura 1.**

As arboviroses são responsáveis por epidemias com grande impacto em saúde humana e veterinária (VASCONCELOS, et al., 1992). No Brasil as principais arbovírus são a febre do Dengue (*Flavivirus*), a Febre Amarela (*Flavivirus*), febre do Zika (*Flavivirus*) (FARIA et al., 2016), a febre do Mayaro (*Alphavirus*), a febre do

Chikungunya (*Alphavirus*), e a febre do Oropouche (*Orthobunyavirus*) (FIGUEIREDO, 2000, 2007, 2017).

Figura1: Ciclos de transmissão de arbovírus. Ciclos de transmissão pelos quais são mantidos os arbovírus na natureza, (a) ciclo silvestre que possuem como hospedeiros intermediários/reservatórios primatas não humanos e (b) ciclo urbano, onde ocorre infecção humana (PETERSON, 2010).

1.2 Gênero Alphavirus

Os *Alphavirus* (*Togaviridae*) são vírus esféricos com 60 a 70nm de diâmetro e capsídeo de simetria icosaédrica, envolto por um envelope lipídico com espículas proteicas em sua superfície, como mostrado na **Figura 2**. O genoma dos *Alphavirus* consiste de RNA de fita simples, linear, de polaridade positiva (STRAUSS et al, 1994; KHAN et al, 2002). O genoma contém de 11.000 a 13.000 nucleotídeos que codificam 8 genes incluídos em duas ORFs (Open Reading Frames - ORFs): a primeira localizado na posição 5' do genoma, codifica as proteínas não-estruturais (NsP1, NsP2, NsP3 e NsP4) e a segunda, na posição 3' do genoma, em região controlada por promotor subgenômico, codificando as glicoproteínas estruturais E1, E2, E3 e 6K, como mostrado na **Figura 2** (JOSÉ, 2009; GRIFFIN, 2007; FAUQUET et al, 2005; STRAUSS, 1994).

Figura 2: Representação da estrutura dos Alphavirus. Observa-se a estrutura icosaédrica do vírion, composta por três proteínas estruturais: as proteínas do envelope (E1 e E2) e a proteína do capsídeo (C). As proteínas E1 e E2 formam tríades de glicoproteínas, em forma de espigas, ancoradas a membrana que cobre a superfície viral. O genoma possui duas ORFs, a primeira localizada na região 5', codifica as proteínas não- estruturais (NsP1, NsP2, NsP3 e NsP4) e a segunda na região 3', codifica as glicoproteínas estruturais E1, E2, E3 e 6K. **Fonte:**http://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species

São conhecidas 31 espécies de vírus pertencentes ao gênero *Alphavirus* (ICTV, 2011). Esses vírus ocorrem em todo o mundo e podem ser divididos como Vírus do Velho Mundo e do Novo Mundo (STRAUSS e STRAUSS, 1994). Entre os *Alphavirus* do Novo Mundo incluem-se os vírus da encefalite equina da Venezuela, do Leste e do Oeste (VEEV, EEEV e WEEV respectivamente), todos associados ao desenvolvimento de doença febril aguda e infecção do sistema nervoso central, em surtos ou esporadicamente, acometendo seres humanos e equinos (LEUNG, 2011; FAUQUET et al, 2005; GRIFFIN, 2007; STRAUSS, 1994). Os vírus O'Nyong-Nyong (ONNV), Sindbis (SINV), Semliki Forest (SFV), Ross river (RRV) são *Alphavirus* do Velho Mundo, e são comumente associados a doenças febris com acometimento articular (RYMAN; KLIMSTRA, 2008).

Os CHIKV e MAYV causam doença febril aguda que pode produzir dor articular e artrite, perdurando por meses ou até mesmo anos. Os sintomas articulares de longa

duração ligados a esses vírus poderiam estar relacionados a uma permanência do patógeno como num santuário nos tecidos articulares, protegido de agressões do sistema imunológico. Sabe-se que estes vírus conseguem escapar da neutralização pelos anticorpos do hospedeiro, escondendo-se em vesículas apoptóticas e mantendo, assim, a infecção em macrófagos por rondas contínuas de infecção seguida de apoptose e fagocitose (SUHRBIER et al, 2012).

O ciclo replicativo dos *Alphavirus* inicia-se com a ligação de proteínas ligantes E1 e E2 da superfície viral aos receptores da célula hospedeira. Após a endocitose, o meio ácido endossômico desencadeia mudanças conformacionais no envelope viral expondo o peptídeo E1. Esse processo promove a fusão do envelope à membrana endossômica celular, permitindo a liberação do genoma viral no citoplasma da célula hospedeira (CHO, 2008) (**Figura. 3**).

O RNA de polaridade positiva, livre no citoplasma celular, é rapidamente traduzido em uma poliproteína não-estrutural (NSP1234) que é clivada, gerando as proteínas não estruturais NSP1 e NSP4. Essas proteínas formam um complexo que realiza a replicação do genoma viral e a transcrição do RNA, sintetizando um RNA de cadeia negativa intermediário e com o comprimento total do genoma que servirá como molde para a síntese de RNA subgenômico (26S) e o genômico (49S) (SOLIGNAT et al., 2009). O RNA subgenômico (26s) origina a poliproteína precursora das proteínas estruturais (C-pE2-6K-E1), que é processada em passos posteriores. O capsídeo (C) é liberado e as glicoproteínas E1 e pE2 se associam ao aparelho de Golgi, sendo exportadas para a membrana plasmática, onde pE2 é clivada em E2 e E3. Deste modo, a montagem é promovida pela ligação de 28 proteínas do núcleo capsídeo viral ao seu RNA e pelo recrutamento das glicoproteínas de envelope associadas à membrana. Finalmente, as novas partículas de *Alphavirus* recém-montadas são liberadas para o meio extracelular (SNYDERA & MUKHOPADHYAY, 2012; SOLIGNAT et al., 2009; SHWARTZ; ALBERT, 2010). Este esquema replicativo é mostrado na **Figura 3**.

Figura 3: Ciclo replicativo dos Alphavirus. 1: ligação ao receptor de membrana. 2: endocitose. 3: acidificação do vacúolo. 4: fusão de membranas. 5: desmontagem do core. 6: tradução. 7: processamento. 8 e 9: transcrição. 10: tradução. 11: processamento. 12: processamento de maturação de glicoproteínas. 13: transporte de glicoproteínas processadas e ativação por furina. 14: empacotamento do genoma viral. 15: montagem do nucleocapsídeo. 16: brotamento dos virions. Fonte: OLIVEIRA MOTA et al. (2015).

1.2.1 Vírus Mayaro (MAYV)

O MAYV foi isolado pela primeira vez de trabalhadores florestais febris em Trinidad e Tobago, no Caribe, em 1954. Desde então, diversos surtos por MAYV foram identificados na América Latina (MOTA et al., 2015), como por exemplo, no norte da América do Sul e na bacia do rio Amazonas (RYMAN et al., KLIMSTRA 2008). No Brasil, diagnosticou-se a infecção por MAYV em vários indivíduos com febre e cefaleia frontal, na área do Rio Guamá, Estado do Pará.

São conhecidos dois genótipos do MAYV: O genótipo D, que foi isolado em Trinidad e Tobago, e posteriormente detectado no Brasil, Peru, Suriname, Bolívia e Guiana; E o genótipo L, que circula apenas no Brasil (NAPOLEÃO-PEGO et al., 2014; POWERS et al., 2006).

MAYV é um vírus zoonótico transmitido por mosquitos *Haemagogus*, que tem como principais hospedeiros os primatas e aves, ocorrendo principalmente na região amazônica (HALSEY et al., 2013). A infecção humana por MAYV causa uma doença febril aguda e em alguns casos exantemática, coincidindo com a viremia e que pode durar de 3 a 5 dias. Após esta fase, alguns pacientes apresentam artralgia de grandes articulações, consequência da artrite, que pode durar semanas ou até meses (PINHEIRO et al. 1982; HALSEY et al., 2013).

São elevados os níveis de anticorpos para MAYV na população da Amazônia. Em estudo no norte do estado do Amazonas, observou-se que mais de 40% da população ribeirinha do Rio Negro possuía anticorpos e, portanto, já havia sido infectada pelo vírus (ABAD-FRANCH et al., 2012). Diversos surtos de febre do Mayaro têm sido descritos na Amazônia, atingindo, inclusive, grandes cidades. Nos anos de 2007 e 2008, foram diagnosticados 33 casos de febre do Mayaro na cidade de Manaus (MOURAO et al., 2009). Em fevereiro de 2008, 36 casos foram descritos em Santa Bárbara, no Estado do Pará (AZEVEDO et al., 2009). Em um estudo de soroprevalência ocorrido entre 2007 e 2008, foi demonstrada a circulação do MAYV em Juruti, no Pará. Já em um inquérito soro-epidemiológico realizado no município Juriti, no Estado do Pará, ao se analisar 1597 indivíduos, observou-se que 20 apresentavam anticorpos contra MAYV (CRUZ et al., 2009). Entre 2010 e 2013, um surto por MAYV com 16 pacientes foi notificado na Amazônia Peruana (HALSEY et al., 2013). Ademais, tem sido descritos casos de febre do Mayaro em viajantes que chegam em países europeus após visita à Amazônia (HASSING et al., 2010; NEUMAYR et al., 2012; RECEVEUR et al., 2010).

Brunini e colaboradores (2017) investigaram pacientes febris negativos para dengue e Chikungunya que visitavam áreas rurais perto de Goiânia e Goiás, encontrando uma alta proporção de MAYV IgM (55%) (BRUNINI et al., 2017). Esses dados indicam a presença de uma alta prevalência de MAYV em algumas áreas da região central do Brasil, sendo que a investigação laboratorial do MAYV como diagnóstico diferencial com DENV, CHIKV e Zika vírus deve ser considerada.

Em conjunto com os dados do vírus MAYV coletados fora da Amazônia, nota-se que não há uma notificação compulsória da doença, sendo que, pelo fato dos sintomas se assemelharem ao de outras doenças febris, há diversos equívocos nos diagnósticos realizados, gerando, assim, um quadro de subnotificação.

1.2.2 Vírus Chikungunya (CHIKV)

Outro importante alphavírus que emergiu nas Américas é o vírus Chikungunya (CHIKV). O CHIKV foi isolado pela primeira vez em amostras de sangue obtidas durante epidemia *dengue-like*, ocorrida em 1952-1953 na Tanzânia, sudeste da África (GRIFFIN, 2007). O vírus produz doença febril aguda com dor nas articulações, manifestação clínica que serviu de inspiração para o nome Chikungunya, que no dialeto regional Makonde significa “andar encurvado sobre o corpo” (ROBINSON, 1995; ROSS, 1956).

No ano de 2005, um grande surto de CHIKV ocorreu em ilhas do Oceano Índico, atingindo diversos países da Ásia nos anos seguintes e causando a infecção de mais de 1,9 milhões pessoas (TAUIL, 2014). Em 2007 a Itália registrou um surto com 197 casos de infecção por CHIKV transmitida por *Aedes albopictus* (WHO, 2016).

CHIKV chegou às Américas pela primeira vez no ano de 2013. Em outubro deste ano foram diagnosticados os primeiros casos autóctones na Ilha de Saint Martin, no Caribe Francês (CASSADOU et al., 2014; PAHO, 2015). Iniciava-se uma enorme epidemia que se alastrou por mais de 43 países americanos, onde foram registrados 1.300.000 casos e 191 óbitos, em 2014 (WEVER et al., 2015; WHO, 2016). Na Guiana Francesa, ilhas do Caribe, Venezuela, Guiana e Colômbia, milhares de casos de CHIKV continuam a ser notificados nos últimos anos (INTERNATIONAL-SOCIETY-FOR-INFECTIOUS-DISEASES, 2014; PAHO, 2015).

Como aponta o East-Central-South-African (ECSA), o genótipo do CHIKV circula no Brasil desde 2013 (SOUZA et al., 2019). Foram notificados até maio de 2020, 40.352 casos prováveis de doença pelo vírus Chikungunya. Destes, ocorreram 20.905 na região Nordeste, 17.350 na região Sudeste, 924 na região Norte, 5414 na região Sul e 632 na região Centro-Oeste (MINISTÉRIO-DA-SAÚDE, 2020). Considerando a alta infestação urbana de mosquitos *Aedes*, o que aumenta a capacidade de disseminação do vírus CHIKV, se faz necessário redobrar a atenção para que o CHIKV não reproduza grandes epidemias todos os anos, tal qual o vírus Dengue (AZEVEDO, 2015; FIGUEIREDO, 2000).

1.3 Arboviroses e Transfusão Sanguínea

A transfusão sanguínea foi realizada pela primeira vez em 1628, após a descoberta da circulação sanguínea por William Harvey. Tais estudos, iniciados no século 17, permitiram em 1818 a primeira transfusão sanguínea bem sucedida em humanos, realizada por James Blundell (LEAROY, 2012). Em 1901, Landsteiner detalhou os grupos sanguíneos A, B e C, que posteriormente foi denominado O, recebendo o Prêmio Nobel de Medicina em 1930 pela descoberta do grupo ABO humano, visto que esta foi uma descoberta fundamental para o exercício e evolução da hemoterapia.

Desde o início da prática da transfusão sanguínea, a transmissão de agentes patogênicos (bactérias, parasitas e vírus) pelo fluido transfundido tem sido uma preocupação constante. Contudo, testes buscando por agentes virais contaminando

hemoderivados começaram a ser utilizados somente em 1971, voltados para o vírus da hepatite B e utilizando o antígeno viral de superfície (HBsAg) (TOBLER; BUSH, 1997). Posteriormente, a preocupação pela busca de agentes patogênicos em sangue e hemoderivados ficou evidente com a AIDS, a partir da década de 80. Em 1983, o Stanford Blood Center foi o primeiro a investigar o sangue em busca de infecções pelo HIV, em linfócitos T infectados. Porém, apenas em 1985 foram licenciados os primeiros testes sorológicos imunoenzimáticos (ELISA) para diagnóstico da infecção pelo HIV (PERKINS; BUSCH, 2010). Ao longo dos anos outros testes foram implementados para detectar infecções virais em bancos de sangue, tais como HTLV (1989) e hepatite C (1990). Os testes para detecção destes vírus são continuamente atualizados para melhorar suas sensibilidades e especificidades.

Como atenção preventiva à saúde do receptor de hemoderivados, alguns cuidados e medidas são tomados nos bancos de sangue. O candidato a doador de sangue deve ser uma pessoa sadia e que atenda a requisitos básicos para a doação de sangue, sendo que a doação deve ser voluntária, anônima e altruísta (UBIALI, 2015). O processo de coleta do sangue se inicia com a coleta de bolsa de sangue total, que é processada para separação dos componentes derivados, tais como concentrados de hemácias, plaquetas, plasma e crioprecipitado. São realizados no Brasil testes para antígeno de superfície da hepatite B (HBsAg), anticorpo do core do vírus da hepatite B (anti-HBc), NAT para hepatite B, anticorpo do vírus da hepatite C (anti-HCV), NAT para hepatite C, anticorpo do vírus da imunodeficiência humana (anti-HIV), NAT para vírus da imunodeficiência humana (HIV), anticorpo do vírus linfotrópico T humano I/II (anti-HTLVI/II), Venereal Disease Research Laboratory (VDRL) (sífilis), detecção do anticorpo anti-*Trypanosoma cruzi* (doença de Chagas) em amostras colhidas de cada sangue doado, pesquisando, assim, por uma miríade de agentes infecciosos que possam ser transmitidos pelas transfusões (UBIALI, 2015; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2017).

Segundo as orientações fornecidas pela Associação Brasileira de Hematologia, Hemoterapia e terapia celular (ABHH), até o presente momento não há nenhum teste molecular ou sorológico licenciado para triagem de arbovírus em doadores de sangue no Brasil (UBIALI, 2015). A preocupação com a transmissão de arbovírus por transfusão sanguínea aumentou após a documentação da transmissão de West Nile Vírus (WNV) por transfusão, nos EUA (PEALER et al., 2003). O primeiro caso de infecção pelo WNV,

foi causado pela transfusão de hemocomponentes em uma paciente durante procedimento obstétrico, em 30 de agosto de 2002 (HARRINGTON et al., 2003)

Sabe-se que infecções transmitidas pelo sangue continuam a ser um risco para a transfusão sanguínea. Enquanto a triagem de rotina de hemocomponentes doados reduziu enormemente o risco de transmissão do HIV, dos vírus da hepatite B e C, outros vírus podem estar sendo transmitidos sem notificação. Assim, além do WNV, muitos outros arbovírus poderiam afetar de forma semelhante à segurança da transfusão por produzirem viremias assintomáticas transitórias em doadores durante surtos explosivos, ou períodos com altas incidências destas viroses. Os arbovírus podem ser potencialmente transmitidos via transfusional por produzirem fases virêmicas assintomáticas (PATY, 2013).

Alguns arbovírus, como Dengue, West Nile, Zika e Chikungunya, já foram notificados ao serem transmitidos por transfusão sanguínea a partir de doadores infectados (OH, 2015; LEVI, 2016; LIU, 2019).

Os primeiros surtos de Dengue no Brasil teriam ocorrido no Rio de Janeiro, em 1846 e 1897. Em 1923, Antônio Pedro descreveu um surto de dengue na cidade de Niterói, Rio de Janeiro, ressaltando o quadro clínico da doença, e desde então o Dengue tem sido um grave problema de saúde pública em nosso país, causando grandes epidemias todos os anos (FIGUEIREDO, 2000). Em 2006, Beatty e colaboradores avaliaram o risco de transmissão de Dengue via transfusional em Porto Rico, observando que a cada 1.300 doações, uma conteria o vírus (BEATTY et al., 2006). Em 2010, Dias e colaboradores analisaram 500 amostras de doadores de sangue do Centro Regional de Hemoterapia, do Hospital das Clínicas da FMRP-USP e detectaram o vírus do Dengue sorotipo 3 em duas amostras (DIAS et al., 2012).

Além do Dengue, outra arbovirose de grande destaque em nosso país é a Febre Amarela. A Febre Amarela (YFV) foi introduzida no Brasil pelo comércio de escravos africanos, causando grandes epidemias no Século XIX (FIGUEIREDO, 2007). O último relato de transmissão urbana de febre amarela no Brasil ocorreu em 1942, no estado do Acre. Após esse período, mesmo com a alta eficácia da vacina com o vírus 17D atenuado, surtos originados por ciclo silvestre de YFV têm ocorrido em alguns estados brasileiros (MASCHERETTI et al., 2013; MORENO et al., 2011). Entre dezembro de 2016 e o final de junho de 2017, ocorreram 777 casos humanos da doença em 10 estados brasileiros, a maioria em Minas Gerais (MG) (60% dos casos), seguido pelo Espírito Santo (32%), Rio

de Janeiro (3%) e São Paulo (3%) (FARIA et al., 2018). Não se tem descrição da transmissão do vírus da Febre Amarela via transfusão de sangue.

O vírus Zika teria sido introduzido no Brasil durante eventos esportivos internacionais ocorridos em 2013 (FARIA et al., 2016), causando epidemias de grandes proporções. O Zika teve seu genoma detectado em um doador de sangue na cidade de Campinas, Estado de São Paulo, no ano de 2015 (BARJAS-CASTRO et al., 2016). O fato de aproximadamente 80% de infecções por Zika serem assintomáticas, reforça a importância de sua pesquisa em bancos de sangue (BRASIL, 2015).

Na região Amazônica, outro importante arbovírus é o Oropouche, que causa graves epidemias nesta região, produzindo uma doença febril aguda que, ocasionalmente, está associada à meningoencefalite. Já foram notificados cerca de 500.000 casos, sendo esta a terceira arbovirose em número de casos no Brasil (AZEVEDO et al., 2007; VASCONCELOS et al., 2011; MOURÃO et al., 2009). Contudo, ainda não existem relatos sobre avaliações da transmissão do vírus Oropouche em produtos do sangue.

Quanto aos *Alphavirus*, são poucos os relatos de transmissão via transfusional. Na Ilha de São Martinho, no Caribe, foram avaliados, em 2014, 2.149 amostras de plasma, bem como seus respectivos doadores, até 72 horas após a doação. Em 4 destes plasmas foram detectado o genoma do CHIKV e 2 destes doadores manifestaram síndrome febril, de 12 a 24 horas após a doação (GALLIAN et al., 2014). Um estudo de soroprevalência realizado entre 2015 e 2016, apresentou soroprevalência para IgG anti-vírus Chikungunya de uma amostra (0,2%) obtida no Centro de Hemoterapia de Macapá e nenhuma amostra do Hemocentro de Ribeirão Preto foi soro reativa para IgG anti-vírus Chikungunya (SLAVOV et al., 2018). Entretanto, no Brasil, até o momento nenhum *Alphavirus* foi detectado em produtos do sangue, visto que não há triagem para arbovírus nos bancos de sangue.

Considerando a epidemiologia dos *Alphavirus* no Brasil e reconhecendo que estes vírus podem induzir infecções com altas viremias, como é o caso do CHIKV que pode apresentar 10^8 cópias de RNA viral/mL, além de poderem causar entre 3 a 28% de infecções assintomáticas, reforça-se a necessidade de um rigoroso controle das amostras de banco de sangue, para evitar transmissão transfusional (DUTTA et al, 2014).

O número limitado de doenças por arbovírus transmitidas por transfusão sanguínea é explicado através da barreira imune, produzida pela alta soroprevalência de

anticorpos para estes arbovírus em áreas endêmicas. Entretanto, faltam pesquisas de infecções pós-transfusão em receptores que apresentam sintomas mais comuns, como febre e cefaleia. Além disso, a patogenicidade viral pode ser reduzida quando o patógeno é infundido na corrente sanguínea sem a participação do vetor, como no caso do papel desempenhado pela intensa resposta inflamatória desencadeada pela saliva do mosquito (LEVI et al., 2014).

2. JUSTIFICATIVA

Considerando a grande frequência das epidemias causadas por arbovírus no Brasil, estes patógenos poderiam ser veiculados por doadores virêmicos sintomáticos/assintomáticos contaminando receptores, através da doação de hemocomponentes. Receptores de sangue, na maioria das vezes, são debilitados ou fazem uso de imunossupressores e, ao receberem sangue contaminado com tais vírus, poderiam desenvolver doença febril aguda, encefalites, febres hemorrágicas e outras complicações graves (FRANCIS et al., 2012; GAIBANI et al., 2012; PIERRO et al., 2013). Geralmente os profissionais de saúde não consideram a possibilidade da transmissão de arbovírus via transfusional, devido à falta de conhecimento destes vírus e também, pela falta de uso de métodos laboratoriais diagnósticos para arbovírus em bancos de sangue.

Este fato é preocupante, pois não é possível prever a morbidade e a mortalidade destes vírus em enfermos. Portanto, decidimos realizar este estudo com 2 arbovírus de importância em saúde pública no Brasil, os *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro, analisando a possibilidade da transmissão dos mesmos em hemoderivados.

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Avaliar a infectividade dos arbovírus *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro em hemocomponentes.

3.2. Objetivos Específicos

- ✓ Avaliar a infectividade dos *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro em produtos do sangue tais como concentrado de hemácias, plaquetas e plasma, com quantificação viral em unidades formadoras de *plaques* (PFU/mL) e qPCR equivalente a PFU/mL
- ✓ Pesquisar a infecção por *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro em leucócitos do sangue periférico como linfócitos B (CD19⁺ CD20⁺), linfócitos T (CD3⁺ e CD4⁺), monócitos (CD14⁺) e macrófagos (CD68⁺).
- ✓ Avaliar a infectividade dos *Aphavirus* Chikungunya e Mayaro em linhagens celulares de linfócitos T CD4⁺ (A30-1), de monócitos (THP-1) e de megacariócitos (MEG-1) quantificando os vírus por qPCR equivalente a PFU/mL.

MATERIAL E METODOS

4. MATERIAL E MÉTODOS

Este Projeto foi desenvolvido no Centro de Pesquisa em Virologia da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto da Universidade de São Paulo (CPV-FMRPUSP), em colaboração com o Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos.

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética da Santa Casa de São Carlos e pelo Comitê de ética e Pesquisa do HCFMRP-USP (Parecer2019/3.252.505).

4.1. AMOSTRAS

4.1.1. Amostras de doadores de sangue

Neste estudo foram utilizadas 8 unidades de bolsas de sangue total de doadores voluntários do Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos. Estes doadores tem entre 18 e 60 anos e, após passarem por avaliação padrão de banco de sangue, NAT HIV, HCV e HBV e testes sorológicos para HIV-1/2, HCV, HBV, HTLV-1/2, *Treponema pallidum* e *Trypanosoma cruzi*, foram caracterizados como sem nenhum tipo de infecção. Não foram incluídos no estudo indivíduos que tiveram doença de caráter febril nos últimos dois meses, ou que estivessem fazendo uso de medicamentos antimicrobianos ou anti-inflamatórios.

4.2. Preparação dos Estoques virais

A linhagem do vírus Mayaro cepa BeAr20290 (MAYV), originalmente isolada do mosquito *Haemagogus sp*, em 1960, e a do vírus Chikungunya cepa S27- African (CHIKV), ambas mantidas na viroteca do Centro de Pesquisa em Virologia da FMRP-USP, foram utilizadas neste estudo. As sementes virais foram mantidas por passagem em células VERO de rim de macaco verde africano (ATCC, CCL81).

MAYV e CHIKV foram utilizadas para infectar células VERO. As células foram mantidas em MEM (Vitrocell, Campinas) suplementado com 10% de soro de fetal bovino (SFB) e 1% de antibiótico e antimicótico (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL). Para a infecção, frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA), exibindo monocamada celular com confluência de aproximadamente 70%, foram lavadas com (PBS) e inoculadas com 100μl de solução contendo o vírus. Após a inoculação, os frascos foram mantidos em estufa a 37°C sob agitação constante, por 1h. Posteriormente, adicionou-se MEM suplementado com 2% de SFB. O frasco foi mantido em estufa até o surgimento

de efeito citopático (ECP), quando o meio de cultivo contendo o vírus foi colhido, centrifugado (1000 rpm e a 4°C, por 20 minutos), aliquotado e armazenado a -80°C. A comprovação da infecção viral foi feita por teste de imunofluorescência indireta (IFA), utilizando sobre as células infectadas soro imune murino contra MAYV ou CHIKV. Outro teste utilizado nesta confirmação de infecção foi a RT-PCR, como mostrado abaixo. Foi utilizada, também, uma alíquota para a quantificação viral pela técnica de ensaio de placa.

4.3. Linhagens celulares

As linhagens celulares (A30-1) foram cedidas pelo Laboratório de Tráfego de Proteínas e Interação Vírus-célula da FMRP-USP, THP-1 pelo Laboratório de Biologia Celular e Tecidual da FMRP-USP. MEG-1 (ATCC CRL-2021). Estas células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado (10% de FBS). Os cultivos celulares foram incubados a 37 ° C, atmosfera com 5% de CO₂. Para a verificação da viabilidade celular, as células foram coradas e contadas com azul de Tripán 0,4% para o posterior inóculo em placas.

4.4. Teste de Imunofluorescência Indireta

Para identificar antígenos virais, utilizou-se teste de imunofluorescência indireta (IFA) que confirmam a infecção em células VERO, em culturas de Linfócitos TCD4+ (A30-1) imortalizados, em Monócitos (THP-1), em Megacariócito (MEG-1) e célula mononuclear do sangue periférico (PBMC), neutrófilo polimorfonuclear (PMN). Para tanto, culturas de células aderentes sob lâminas de vidro circulares, em placas de 24 poços, foram infectadas e incubadas até aparecimento de ECP. Como alternativa, células não aderentes foram semeadas em placas de 24 poços tratadas com polisina, infectadas e após surgimento de ECP, foram colhidas, centrifugadas e lavadas com PBS.

Em sequência foram suspensas e novamente adicionadas à placa de 24 poços para secagem a temperatura ambiente. Posteriormente, as células infectadas foram fixadas com solução a 4% e gelada de paraformaldeído durante 10 minutos, seguindo-se por lavagem com PBS. As culturas foram recobertas com solução a 1% de BSA e saponina, durante 30 minutos, e também com uma solução block (SuperBlock Blocking Buffer in PBS Pierce) por mais 30 minutos, ambas para bloqueio de reações inespecíficas.

As proteínas virais foram detectadas por meio de fluorescência indireta utilizando soros hiperimunes de camundongo (1:100) e o secundário Alexa Fluor 488 anti –mouse (1:1000). Para os diferentes fenótipos celulares, foram utilizados anticorpos comerciais de coelho anti- CD3 (Abcam, ab 5690) anti- CD4 (Abcam, ab 133616), anti-CD8 (Abcam, ab-4055), anti- CD19 (Abcam, ab-134114) Anti CD20 (Abcam, ab-27093), anti CD68 (Dako, lot 00080249), anti CD14 (Abcam, ab-133335), que são marcadores de linfócitos TCD4, linfócitos TCD8, linfócitos B (CD19/20), macrófago (CD68) e monócito (CD14), respectivamente seguidos de incubação com secundário ALEXA flúor 594 anti-rabbit. As células foram mantidas com os anticorpos primários overnight e com secundários + DAPI por 30 minutos.

Finalmente, as lâminas foram visualizadas em microscópio, sob luz ultravioleta, buscando por fluorescência citoplasmática indicativa da presença viral na célula (RIBEIRO et al., 2018).

4.5. Técnica para a RT-PCR

4.5.1. Extração do RNA

A extração de RNA foi realizada com o reagente caotrópico Trizol LS Reagent® (Invitrogen, USA), conforme instruções do fabricante. Em resumo, para cada 250µL de amostra, adicionaram-se 750µL de Trizol LS Reagent. Homogeneizou-se a mistura por 15 segundos em *vortex* e acrescentaram-se 200µL de clorofórmio ultra puro (100% livre de DNases e RNases), agitando-se por inversão. Após 10 minutos em temperatura ambiente (TA), as amostras foram centrifugadas a 12000xg em temperatura de 4°C, por 15 minutos. Transferiram-se 500µL do sobrenadante para microtubo com capacidade para 1,5mL. Precipitou-se o sobrenadante em 500µL de isopropanol, após incubação de 10 minutos a TA e centrifugação por 10 minutos a 12000xg, a 4°C. O isopropanol foi descartado, as amostras foram lavadas em 1000µL de etanol 75% e secas em TA por 20 minutos. Ao final, o RNA foi eluído em 50µl de uma solução tampão de eluição livre de RNase e armazenado a -70°C.

4.5.2. Quantificação por RT-PCR em tempo real para Chikungunya e Mayaro

Utilizaram-se neste estudo, duas RT-PCRs em tempo real específicas para cada vírus (ESPOSITO, et al 2017, WAGGONER, 2018). Tais técnicas utilizam os sistemas

TaqMan ou o *OneStep RT-PCR Kit* (TaqMan Fast vírus -1 Step Master mix 4X), ambas seguindo as instruções do fabricante. Para amplificação foram utilizados os *primers* e sondas listados nas Tabelas 1 e 2.

Tabela1: *Primers* para RT-PCR de Chikungunya, na região codificadora da proteína do capsídeo.

PRIMERS		POSIÇÃO
FORWARD	GACAATGCGCGCGGTACC	7711 - 7728
REVERSE	TGTTGTTTTGTGGCGCCT	7782 - 7799
SONDA	GCCACG CAGGAATCGGAAGAATAAGAAGC	7738 - 7766

Tabela 2:*Primers* para RT-PCR de Mayaro, na região codificadora de NS1.

PRIMERS		POSIÇÃO
FORWARD	AAGCTCTTCCTCTGCATTGC	51–70
REVERSE 1	TGCTGGAAACGCTCTCTGTA	141–160
REVERSE 2	TGCTGGAAATGCTCTTTGTA	
SONDA	GCCGAGAGCCCGTTTTTAAAATCAC	116–140

A quantificação de cópias de RNA viral em cada amostra foi calculada com base em um padrão de RNA extraído de estoque viral, cujo título em PFU/mL já havia sido pré-determinado por ensaio de placa. O número de cópias de RNA viral em cada diluição da curva padrão foi considerado igual ao equivalente a PFU correspondente à amostra utilizada para extração.

4.6. Quantificação dos estoques virais por plaqueamento (PFU/mL)

Quantificaram-se os vírus estudados por técnica das *plaques* de lise nos estoques virais, em hemocomponentes de sangue e culturas de células inoculados com MAYV e CHIKV (KAUR et al., 2016). Para tanto, placas de 24 poços foram semeadas com 2×10^5 células VERO por poço e incubadas por 24h a 37°C. No dia seguinte, lavou-se a monocamada confluyente de células com PBS e inocularam-se diluições decimais de 10^1 a 10^{10} do estoque viral, ou do sobrenadante de cultura celular infectada. As placas foram incubadas por 1h em estufa a 37°C, sob leve agitação, para adsorção viral. Em seguida, adicionou-se aos orifícios 1mL de *overlay*, uma solução contendo MEM suplementado

com 3% de Carboximetilcelulose estéril (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA), 2% de SFB e 1% de PSA. Incubaram-se as placas a 37°C em atmosfera com 5% de CO₂, observou-se diariamente até a formação dos *plaques* de lise. Ao final, os *plaques* foram claramente revelados, desprezando-se o *overlay* e fixando-se as células com solução a 10% de formol em PBS.

Após desprezar o formol, as células foram coradas com Preto de Naftaleno (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA). Para o cálculo da quantidade ou título viral, as *plaques* individualizadas e claramente visíveis foram contadas. Com base nos números de *plaques* e nos volumes das diferentes diluições virais, determinou-se o título viral em unidades formadoras de placas por mililitro (PFU/ml), utilizando a seguinte fórmula.

$$\text{PFU/mL} = \text{média nº plaque} \times \text{diluição} / \text{volume do inoculo}$$

4.7. Obtenção e processamento de bolsas de sangue

Após a coleta do doador, as bolsas contendo o sangue total são processadas para obtenção separada dos hemocomponentes (CIOFFI; NEVES, 2007). Os hemocomponentes são obtidos por centrifugação da unidade de sangue total (ST), sendo células sanguíneas separadas segundo seus diferentes tamanhos e densidades. Tais hemocomponentes são o concentrado de hemácias, o concentrado de plaquetas, o plasma fresco congelado, o crioprecipitado e o concentrado de granulócitos (LÉLIS; PINHEIRO, 2007).

4.8. Inoculação nas bolsas de sangue

Diariamente, no Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos, algumas bolsas de sangue são recusadas. Atualmente são considerados parâmetros de inaptidão clínica à doação: comportamento sexual de risco, amamentação, doenças infecciosas e cardiovasculares, epilepsia, encarceramento, gravidez, histórico de reação transfusional, idade avançada ou muito jovem, jejum no dia da doação, período menstrual, baixo peso ou sobrepeso, *piercings* e tatuagens, procedimentos dentários, uso de drogas, vacinas, temperatura corporal elevada, uso de certos medicamentos e algumas cirurgias (BRASIL, 2011). No presente estudo, foram selecionadas 8 bolsas para uso algumas dessas bolsas que seriam descartadas, após passarem por avaliação e serem certificadas por NAT HIV,

HCV e HBV e testes sorológicos para HIV-1/2, HCV, HBV, HTLV-1/2, *Treponema pallidum* e *Trypanosoma cruzi*, como sem nenhum tipo de infecção.

Os 8 doadores foram previamente orientados quanto ao uso de suas amostras para projetos de pesquisa, assinando Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), já aplicado usualmente pelo Bando de Sangue. Neste Termo, o doador concorda em deixar amostras armazenadas no Banco de Sangue da Santa Casa de São Carlos visando possíveis pesquisas.

Para o estudo, 4 bolsas contendo sangue total foram infectadas em duplicatas com 10^6 PFU/mL de CHIKV e 10^7 PFU/mL de MAYV e 4 bolsas foram utilizadas como controle negativo. Estes teores virais são compatíveis com aqueles observados em viremias por CHIKV em casos assintomáticos (CHIU et al., 2014). Quanto a MAYV, como não existem trabalhos sobre sua transmissão por transfusão sanguínea, optamos por utilizar 10^7 PFU/ml. Para as infecções, 500 uL do inoculo viral foram injetados na porção tubular da bolsa de sangue total. Os procedimentos de infecção foram realizados após o término da rotina diária do Banco de Sangue, para total segurança dos produtos aptos a serem transfundidos.

Após as infecções, as bolsas foram incubadas por 12 horas, simulando o tempo em que as mesmas podem ficar em descanso antes do processamento. Outras bolsas infectadas foram mantidas por 24 horas, extrapolando o referido tempo. Durante o descanso, as bolsas foram mantidas em temperatura ambiente com homogeneização para adsorção dos vírus. Posteriormente, iniciaram-se os processamentos de separação por centrifugação de baixa rotação, 2600g, por 4:30 min. Dessa forma, foram obtidos concentrados de hemácias e plasma rico em plaquetas. O plasma rico em plaquetas foi transferido para uma segunda bolsa, que foi centrifugada a 5000g por 5 min. permitindo separar concentrado de plaquetas e plasma, que foi transferido para uma terceira bolsa. Ao final obteve-se das bolsas de sangue infectadas os seguintes produtos: concentrado de hemácias, plasma fresco e concentrado de plaquetas. Esses derivados de hemocomponentes podem conter quantidades aceitáveis de leucócitos, como previsto nas legislações que incluem a Portaria de Consolidação nº 04 RDC nº34 (BRASIL, 2014).

Buscando avaliar a presença viral e suas capacidades infecciosas em cada hemocomponente, realizaram-se tentativas de isolamento com quantificação viral e RT-PCR para CHIKV e MAYV. Assim, após o tempo mínimo de armazenagem descrito na

Tabela 3, coletaram-se amostras do concentrado de hemácias em intervalos de 7 dias, com coleta de amostras diárias para o concentrado de plaquetas. Para o plasma, após sua obtenção e inoculação com os estoques virais, foi colhida amostra aqui descrita como tempo zero, então este hemocomponente foi congelamento por 8 meses, tempo máximo em que as bolsas ficaram armazenadas para desenvolvimento deste trabalho, obedecendo as suas condições de armazenamento sob critérios de hemocentro. Imediatamente após o descongelamento foi colhida amostra denominada tempo 8M e uma nova amostra pós 24 horas, em que está bolsa foi mantida a 4°C (Seção III RESOLUÇÃO - RDC Nº 57, DE 16 DE DEZEMBRO DE 2010).

Tabela 3: Temperaturas de armazenamento e períodos de conservação dos hemocomponentes.

TEMPO DE PRESERVAÇÃO DOS HEMOCOMPONENTES		
COMPONENTES	TEMPERATURA DE ARMAZENAMENTO	PERÍODO
CONCENTRADO DE HEMÁCIAS (CH)	4 ± 2°C	35 dias (CPDA-1)
PLASMA FRESCO CONGELADO (PFC)	Abaixo de -30°C (preferível) Entre -20 e -30°C	24 meses 12 meses
CRIOECIPITADO (CRIO)	Abaixo de -30°C Entre -20 e -30°C	24 meses 12 meses
CONCENTRADO DE PLAQUETAS (CP)	22 ± 2°C	4 horas (sistema aberto) Validade original 5 dias (sistema fechado)

CPDA = Citrato, Fosfato, Dextrose, Adenina. Fonte: adaptado de SARAIVA e OTTA, (2007).

4.9. Amostras de sangue de doadores saudáveis

Amostras de sangue de doadores saudáveis do Centro de Pesquisa em Virologia USP-Ribeirão Preto, que concordaram em participar do estudo foram utilizadas para obtenção de PBMC e PMN, descritas no tópico 4.9. Estes indivíduos tem entre 18 e 30 anos, não tiveram doença de caráter febril nos últimos dois meses, ou uso de medicamentos antimicrobianos ou anti-inflamatórios

4.9. Separação de células mononucleares e neutrófilos humanos do sangue periférico

Utilizou-se um volume de 9 mL de sangue total de doadores voluntários em tubo com anticoagulante a base de heparina. A amostra foi centrifugada a 3000 rpm por 10 minutos, em temperatura ambiente, e separou-se o plasma. A amostra foi submetida ao gradiente de Percoll em tubo falcon de plástico. Para tanto, uma mistura foi preparada

delicadamente para que as partes não se misturassem. Incluiu Percoll 72%, Percoll 63%, Percoll 54%, Percoll 45%, meio de Hanks 1x e meio de Hanks 10x concentrado. Adicionaram-se ao tubo de 15ml, gentilmente, inclinando o tubo a 35°, as soluções de Percoll na seguinte ordem: 2mL de solução Percoll 72%, 2mL de solução Percoll 63%, 2 mL de solução Percoll 54% e 2mL de solução Percoll 45%. Posteriormente, adicionaram-se 2,5 mL de sangue na parte superior dos gradientes. Os tubos foram centrifugados por 30 minutos, a 650g, em temperatura ambiente (22°C), aceleração e desaceleração da centrífuga no modo 2, a fim de evitar que as fases se misturem. Finalmente, com o auxílio de uma pipeta Pasteur, retirou-se o plasma e as células mononucleares (PBMC) e, posteriormente, os neutrófilos humanos de sangue periférico (PMN) presentes entre as soluções de Percoll de 72% e 63% um pouco mais abaixo da solução de PBMC. Em tubos separados contendo o PBMC e PMN, adicionou-se volume de 2 mL de uma solução de lise, homogenizou-se e depois centrifugou-se a 400x g, por 8 minutos, a 12°C. As células foram novamente suspensas, em solução de Hanks e lavadas mais uma vez. Centrifugou-se a 400 x g por 8 minutos a 12 °C, aceleração e desaceleração 6 da centrífuga. Os sedimentos PMN e PBMC foram suspensos separadamente com 1 mL de RPMI, adicionando-se o plasma separado das amostras em volume de 500 uL para potencializar o cultivo celular.

As células das linhagens PBMC e PMN foram contadas em câmara de Neubauer com Azul de Tripán. Em seguida, as células PBMC e PMN foram infectadas com CHIKV ou MAYV, em microtubos de 1,5 mL (Corning, NY, EUA). Adsorveu-se por 1 hora a 4°C, lavou-se com PBS 2X, e ressuspendeu-se em meio RPMI contendo 2% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilina-estreptomicina 10.000 U / mL e anfotericina B 200 µg / mL) (Gibco, Gran Island, NY, EUA). Finalmente as células foram incubadas em placas de 24 poços a 37°C, com 5% de CO₂ em 24h.

Estas células foram inoculadas com CHIKV e MAYV a um MOI (multiplicity of infection) de 1, obtendo volume final de 500 uL. A adsorção foi realizada por 1 hora a 4°C. As células foram então lavadas com PBS 2X, suspensas em RPMI com 2% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica, sendo mantidas em placas de 12 poços, a 37°C, em 5% de CO₂. Após 24 horas de infecção, coletaram-se células para realização de fixação celular em lamínulas com 4% de paraformaldeído, lavagem com PBS para realização da imunofluorescência indireta.

5.1 Cinética de replicação do MAYV e do CHIKV nas linhagens de Linfócitos (A30-1), Monócitos (THP-1) e Megacariócitos (MEG-1)

Células de linhagem contínua, os linfócitos A30-1, monócitos THP-1 e megacariócitos MEG-1 foram cultivados em placas de 12 wells, em meio RPMI, com 10% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica (penicilina-estreptomicina 10.000 U / mL e anfotericina B 200 µg / mL) (Gibco, Gran Island, NY, EUA). Estas células foram inoculadas com CHIKV e MAYV a um MOI (multiplicity of infection) de 1, obtendo volume final de 500 µL. A adsorção foi realizada por 1 hora a 4°C. As células foram então lavadas com PBS 2X, suspensas em RPMI com 2% de soro fetal bovino e 1% de solução antibiótica-antimicótica, sendo mantidas em placas de 12 poços, a 37°C, em 5% de CO₂. Após 3, 12, 24 e 48 horas de infecção, coletaram-se separadamente sobrenadante e células para realização de qPCR quantificação viral em PFU/mL, titulação viral pela técnica das *plaques* de lise em PFU/mL e fixação celular em lamínulas com 4% de paraformaldeído, lavagem com PBS para realização da imunofluorescência indireta.

6.0. Análises estatísticas

Para a análise estatística de comparação entre títulos virais, foram usados os programas Graphpad Prism versão 8.1 (La Jolla California USA), adotando-se como probabilidade significativa aquela menor ou igual 0.05 ($p \leq 0.05$). Os dados foram submetidos aos testes One-Way ANOVA ou Kruskal Wallis/ Friedman, quando apropriado. Os testes de Bonferroni ou Dunn foram utilizados para avaliar diferenças entre grupos.

RESULTADOS

7. RESULTADOS

As bolsas de sangue utilizadas neste estudo foram inoculadas com MAYV e CHIKV em teores que simulavam aqueles observados em hospedeiros (*Aedes albopictus* e o *A. aegypti*) infectados e que são aparentemente assintomáticos. Após a infecção as bolsas foram processadas para obtenção dos hemocomponentes: concentrados de hemácias, plaquetas e plasma fresco. Com o acompanhamento temporal destes hemoderivados infectados, pôde-se avaliar a ocorrência e a manutenção da infecciosidade do CHIKV e do MAYV.

As bolsas de sangue foram inoculadas com 10^6 PFU/mL para CHIKV e 10^7 PFU/mL para MAYV, sendo mantidas sob agitação constante por 12 ou 24h. Estes tempos excedem o necessário para infecção viral e são compatíveis com a espera habitual de uma bolsa de sangue antes de seu processamento. Os hemocomponentes obtidos destas bolsas foram armazenados sob condições-padrão em bancos de sangue. Estes hemocomponentes também foram acessados para obtenção de amostras que por sua vez, foram testadas quanto à presença viral e sua quantificação. Realizou-se estes experimentos em duplicata.

Os concentrados de plaquetas foram mantidos a temperatura ambiente por 5 dias, sendo que foram coletadas amostras diárias. Foi possível detectar e quantificar MAYV e CHIKV infecciosos nos concentrados de plaquetas oriundos das bolsas de sangue mantidas por 12 e por 24h. Observaram-se os vírus em todas as amostras colhidas nos diferentes tempos pós-inoculação, registrando-se títulos estáveis de aproximadamente 10^4 PFU/mL para o MAYV e 10^5 PFU/ML para CHIKV, como mostrado nas **Figuras 4. A e B.**

Figura 4: Análise temporal dos títulos de MAYV e CHIKV, em PFU/mL, concentrados de plaquetas oriundos de bolsas de sangue infectadas por 12h e por 24h. Títulos de CHIKV (linha azul) e de MAYV (linha vermelha). n=4

Os concentrados de hemácias foram mantidos por 35 dias a 4°C, com coletas amostrais a intervalos de 7 dias. Ambos os concentrados de hemácias oriundos das bolsas de sangue e mantidas por 12 e por 24h exibiram MAYV e CHIKV infecciosos. Observaram-se variações de teores virais nos diferentes tempos de coleta, com título aproximado de 10^2 PFU/mL para MAYV e de 10^3 PFU/mL para CHIKV, como mostram as **Figuras 5. A e B.**

Figura 5: Análise temporal dos títulos de MAYV e CHIKV, em PFU/mL, infectando concentrados de hemácias oriundas de bolsas de sangue infectadas por 12h e por 24h. Títulos de CHIKV estão na linha azul e de MAYV na linha vermelha n=4

Os plasmas frescos oriundos de bolsas infectadas foram congelados e neles realizaram-se duas coletas amostrais, uma após 8 meses do congelamento e outra também após 8 meses de congelamento, porém, após manutenção por 24 horas a 4°C (8m e 8m+24h). Assim, o plasma fresco foi descongelado, uma amostra foi imediatamente colhida e o plasma foi armazenado a 4°C por 24h, quando se realizou uma nova coleta. Portanto, foram colhidas 3 amostras no tempo 0 após separação do plasma, após 8 meses de congelamento e após 8 meses de congelamento a -20°C e manutenção por 24 horas a 4°C.

Assim como observado para os concentrados de plaquetas e os concentrados de hemácias, também nos plasmas observou-se CHIKV e MAYV infectantes, como mostra a **Figura 6.** Para CHIKV, com base no observado para o tempo 0, o título mais elevado, 10^6 PFU/mL, decaiu a 10^5 PFU/mL nas coletas realizadas após 8 meses e 8m+24h. Os títulos de CHIKV nas amostras obtidas 8m e 8m+24h mostraram-se semelhantes. Para MAYV, o título manteve-se 10^4 PFU/mL nos tempo 0 e 8 meses após descongelamento, caindo a 10^3 PFU/mL na amostra 8m+24h. Estes resultados são mostrados na **Figura 6.**

Figura 6: Análise temporal dos títulos de MAYV e CHIKV em PFU/ml, plasmas frescos congelados oriundos de bolsas de sangue infectadas por 12h e por 24h. Títulos de CHIKV estão na linha azul e de MAYV na linha vermelha. n=4

Os resultados das qRT-PCRs para CHIKV e MAYV obtidos nas amostras de concentrados de plaquetas, exibiram números de cópias de RNA viral compatíveis que corroboram aqueles resultados observados descritos acima, com partículas virais infectantes em PFU/ml. Os genomas de CHIKV e MAYV mantiveram teores semelhantes, sem diferenças estatisticamente significantes nas amostras colhidas para ambos os tempos de infecção, de 12 e 24h, e portanto não variando durante o período de armazenamento de cinco dias, como mostram as **Figuras 7. A e B.**

Figura 7: Quantificação dos genomas de MAYV e CHIKV por qRT-PCR, em número de cópias de RNA viral equivalente a PFU, em concentrados de plaquetas, segundo diferentes tempos iniciais de infecção viral. A) Resultados para o tempo inicial de infecção de 12h; B) Resultados para o tempo inicial de infecção de 24h. As quantificações em número de cópias de RNA nas diferentes amostras, não exibiram diferenças estatisticamente significantes.

As qRT-PCRs dos concentrados de hemácias infectados com CHIKV e MAYV também mostraram resultados em cópias de RNA, que corroboram os anteriores em PFU/ml. Os genomas de CHIKV e MAYV mantiveram resultados semelhantes, sem

diferenças estatisticamente significantes, nas amostras colhidas para ambos os tempos pós-infecção, 12 e 24h, como mostram as **Figuras 8. A e B.**

Figura 8: Quantificação dos genomas de MAYV e CHIKV por qRT-PCR, em número de cópias de RNA viral equivalente a PFU nos concentrados de hemácias segundo diferentes tempos iniciais de infecção viral. A) Após 12 horas de infecção. B) Após 24 horas de infecção. As quantificações, em número de cópias de RNA viral para amostras coletadas nos diferentes tempos analisados não exibiram diferenças estatisticamente significantes.

Ainda analisando os resultados das qRT-PCRs dos plasmas infectados com CHIKV e MAYV, observamos resultados em cópias de RNA que corroboram aqueles obtidos em PFU/ml. Nas amostras colhidas para ambos os tempos de infecção, de 12 e 24h, os números de cópias de RNA mostraram-se semelhantes, sem diferenças estatisticamente significantes, como mostram as **Figuras 9. A e B.**

Figura 9: Quantificação dos genomas de MAYV e CHIKV por qRT-PCR, em cópias de RNA viral equivalente a PFU, nos plasmas, segundo diferentes tempos iniciais de infecção viral. A) Após 12 horas de infecção. B) Após 24 horas de infecção. As quantificações, em número de cópias de RNA viral para amostras coletadas nos tempos 0, 8M e 8M+24pd, não exibiram diferenças estatisticamente significantes.

Nesta primeira parte do trabalho, os resultados obtidos em PFU/ml e em cópias de RNA viral equivalente a PFU, mostram claramente que os hemoderivados oriundos de bolsas de sangue inoculadas com CHIKV e MAYV, em teores compatíveis com aqueles observados em possíveis doadores de sangue virêmicos, mantêm vírus infecciosos em títulos que seriam capazes de infectar os receptores destes hemoderivados. Realmente

CHIKV e MAYV mantêm-se presentes em todo o período de armazenamento destes hemoderivados

Na segunda parte deste trabalho, células mononucleares e neutrófilos humanos do sangue periférico de voluntários foram infectadas *in vitro* por CHIKV e MAYV, sendo analisadas com o objetivo de verificar a infecção nestas células. Para tanto, utilizou-se a técnica de imunofluorescência indireta com soros hiperimunes murinos anti-CHIKV e anti-MAYV produzidos em nosso laboratório (FIGUEIREDO, 1990). Dessa maneira, observaram-se antígenos de CHIKV e MAYV no citoplasma das células mononucleares, como mostram as **Figuras 10. A e B** para CHIKV e **Figuras 10. C e D** para MAYV.

Figura10: Imunofluorescência indireta de PBMC realizada 24 horas após inoculação com os vírus Chikungunya e Mayaro. Observa-se fluorescência verde produzida com o anticorpo policlonal para os vírus CHIK e MAY. O controle negativo DAPI é marcado em azul. a) controle negativo de CHIKV b) Infecção por CHIKV apresentando antígeno viral no citoplasma celular c) controle negativo para o MAYV d) Infecção por MAYV apresentando antígeno viral no citoplasma celular. Objetiva 40X

Linfócitos B (CD19⁺ CD20⁺), linfócitos T (CD3⁺ CD4⁺ e CD8⁺), monócitos (CD14⁺) e macrófagos (CD68⁺) foram fenotipados e detectaram-se suas infecções por CHIKV e por MAYV. Observou-se a infecção dos linfócitos B (CD19⁺ CD20⁺) pela presença de antígenos de ambos os vírus no citoplasma destas células por imunofluorescência indireta, como mostram na **Figuras 11. B e D**. O mesmo ocorreu com os linfócitos T (CD3⁺ e CD4⁺), como mostram nas **Figuras 11. F, H, J e L**. Também observaram-se antígenos de MAYV em monócitos (CD14⁺), como mostra a **Figura 11**.

T e antígenos de CHIKV em macrófagos ($CD68^+$), como mostra a **Figura 11. V**. Ainda, não observaram-se antígenos de CHIKV em linfócitos T $CD14^+$, como mostra a **Figura. 11R** e antígenos de MAYV em linfócitos T $CD68^+$, como mostra a **Figura. 11 X**.

Figura 11: Imunofluorescência indireta de diferentes fenótipos de PBMC inoculados com CHIKV e MAYV. Observam-se núcleos marcados com DAPI em azul, os anticorpos dos murinos policlonais anti-CHIKV e anti-MAYV em verde, e os anticorpos monoclonais para os diferentes fenótipos em vermelho, 24 horas pós-inoculação. a) controle negativo, fenótipo CD19/20. b) PBMC inoculado com CHIKV apresentando antígeno de CHIKV no citoplasma de linfócitos B (CD19/20). c) controle negativo, fenótipo CD19/20. d) PBMC inoculado com MAYV apresentando antígeno viral no citoplasma de linfócitos B (CD19/20). e) controle negativo, fenótipo CD3. f) PBMC inoculado com CHIKV apresentando antígeno de CHIKV no citoplasma de linfócitos CD3+ g) controle negativo, fenótipo CD3. h) PBMC inoculado com

evidenciam a capacidade de expansão destas infecções por via hematogênica e a potencial gravidade das mesmas, produzindo graves manifestações clínicas. Ainda observou-se que neutrófilos do sangue periférico não se infectaram por MAYV ou CHIKV.

A terceira parte deste trabalho incluiu inoculações por CHIKV e MAYV em linhagens celulares contínuas de linfócitos TCD4⁺ (linhagem A30-1), megacariócitos (linhagem MEG-1) e monócitos (linhagem THP-1). Tais inoculações foram feitas *in vitro* procurando-se, em seguida, pela infecção e determinaram-se os teores virais. As culturas celulares foram inoculadas com CHIKV e MAYV no MOI de 1. As amostras dos sobrenadantes de culturas inoculadas e lisados de células, que refletem conteúdo viral intracelular, foram coletadas 3, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação. Teores virais foram titulados em PFU/mL. Como resultado, amostras colhidas em todos os tempos avaliados evidenciaram a presença do vírus infectante, tanto no sobrenadante como no lisado de células, confirmando a susceptibilidade e a permissividade de todas essas células à infecção por CHIKV e MAYV, como mostra a **Figura 13**. Como esperado, vírus não foram detectados no controle negativo.

As análises dos sobrenadantes e lisados celulares de linfócitos A30-1 indicaram que níveis semelhantes de CHIKV e MAYV estavam presentes nas amostras obtidas 3h e 12h pós-infecção, com posterior queda dos títulos virais 24 e 48h pós-infecção, o que mostrou-se mais evidente nos sobrenadantes (p 0,09), especialmente para o MAYV (p 0.03). Observaram-se nas amostras intracelulares um aumento significativo nos títulos MAYV (p 0,007) de aproximadamente 10² PFU/mL e semelhantemente para o CHIKV (p 0.22), nos tempos de 24 e 48h pós-infecção, como mostram as **Figuras 13. A e B**.

Quanto à linhagem de megacariócitos MEG-1, observou-se que tais células se infectaram com CHIKV com 10³ PFU/mL em todos os tempos de coleta amostral, como mostra a **Figura 13**. Todos os sobrenadantes exibiram aumento significativo de 10⁴ PFU/mL de CHIKV, como mostra a **Figura 13. C** (p 0.01). Com tal característica, observou-se uma permissividade significativa nas amostras intracelulares (p 0.04). Resultados similares foram observados com os megacariócitos para o MAYV, exceto nas amostras de 3h, onde não se identificou o vírus, como mostra a **Figura 13. D**. Nos sobrenadantes, elevaram-se os títulos virais de 3 para 12h pós-infecção, atingindo 10³ PFU/mL, com manutenção posterior deste título, em amostras subsequentes (p 0.10). **Figura 13. D.**

A infecção dos monócitos THP-1 com MAYV e CHIKV evidenciou títulos virais mais elevados que nas outras linhagens celulares. Nos lisados celulares observou-se a elevação dos títulos de CHIKV de 12 para 24h pós-infecção, atingindo 10^4 PFU/mL e uma redução do título para 10^2 PFU/mL na amostra de 48h (p 0.32). A mesma elevação foi observada nos sobrenadantes, com títulos de 10^5 PFU/mL 24h e uma redução do título para 10^4 PFU/mL na amostra de 48h pós-inoculação (p 0.98), como mostra a **Figura 13 E**. Com relação ao MAYV, pôde-se observar um aumento progressivo significativo dos títulos virais nos diferentes tempos de coleta amostral do sobrenadante, atingindo 10^5 PFU/mL 48h pós-infecção (p 0.001). Quanto aos lisados celulares, observou-se elevação significativa de títulos virais nas amostras de 3 para a de 12h pós-inoculação (p 0.001), onde atingiu 10^5 PFU/mL, seguindo-se por decréscimo em 24h e 48h pós-inoculação, com 10^3 PFU/mL, como mostra a **Figura 13 F**.

Figura 13: Teores de CHIKV e MAYV (em PFU/ml), infectando linhagens de linfócitos TCD4⁺ A30-1, de megacariócitos MEG-1 e de monócitos THP-1, com base em amostras, coletadas de sobrenadante, em azul e lisado celular, em vermelho (refletindo o intracelular), nos tempos 3, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação. a) Linfócitos T CD4⁺ infectados com CHIKV. b) Linfócitos T CD4⁺ infectados com MAYV. c) Megacariócitos infectados com CHIKV. d) Megacariócitos infectados com MAYV. e) Monócitos

infectados com CHIKV. f) Monócitos infectados com MAYV. Cada ponto de referência foi determinado considerando três infecções independentes.

As amostras do sobrenadante e do lisado celular, obtidas 3, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação de CHIKV ou MAYV, nas culturas de linfócitos TCD4⁺ (A30-1), também tiveram RNA viral quantificado por qPCR. Nos lisados celulares de linfócitos T CD4⁺, observou-se RNA viral em teores ascendentes entre 3 e 12h pós-infecção, o que foi semelhante para ambos os vírus. Os RNAs de CHIKV também mantiveram-se presentes 24h e 48h pós-infecção, como mostra a **Figura 14. A** (p 0.19). Nas amostras de sobrenadante, foi possível observar elevação nos teores do RNA viral nos tempos de 12 a 24h e declínio na amostra de 48h pós-inoculação, como mostra a **Figura 14. A** (p 0.08). Quanto às células inoculadas com MAYV, 12h pós-inoculação observou-se RNA viral no lisado, seguido por redução na amostra de 24h e persistência significativa no tempo de 48h, como mostra a **Figura 14. B** (p 0.0001). Também observou-se elevação significativa do RNA viral em sobrenadante obtido 48h pós-inoculação (p 0.01). É importante ressaltar que nenhuma partícula viral infectante foi detectada no controle negativo.

As amostras do sobrenadante e do lisado celular da cultura de megacariócitos obtidas 3, 12, 24 e 48 horas pós-inoculação de CHIKV ou MAYV, tiveram RNA viral quantificado por qPCR. Observou-se RNA de CHIKV nos lisados celulares nas amostras obtidas 12h e 24h pós-inoculação (p.0.91). Na amostra de 48h pós-inoculação, observou-se uma redução nos teores deste RNA (p 0.14). Por outro lado, observou-se elevação do RNA viral em sobrenadante obtido 48h (p 0.14) pós-inoculação, como mostra a **Figura 14. C**. Por sua vez, para MAYV, observou-se RNA viral em amostras de lisado (p 0.14) e uma aumento significativo (p 0.01) nas amostras de sobrenadante de 48h pós-inoculação, como mostra a **Figura 14. D**.

CHIKV infectou os monócitos THP-1, o que foi evidenciado pela detecção e aumento significativo (p 0.01) dos genomas virais nos lisados celulares (amostras intracelulares) e nos sobrenadantes dos meios de cultura 12 e 24h pós-inoculação. Apenas o sobrenadante obtido 48h pós-inoculação evidenciou presença viral (p 0.28). Observou-se queda nos teores de RNA viral para o mesmo tempo nas amostras de intracelulares, como mostra a **Figura 14. E**. Quanto ao MAYV, observou-se elevação significante (p 0.02) em seus teores de RNA nas amostras intracelulares de 3 para 12h. Após 12 e 24h, observou-se queda nos teores do RNA viral em amostras intracelulares nos tempos 24 e

48h. Nas amostras de sobrenadante, observou-se um aumento significativo ($p = 0.02$) de RNA viral, como mostra a **Figura 14. F**.

Figura 14: Quantificação do genoma viral nos linfócitos TCD4⁺ (linhagem A30-1), megacariócitos (linhagem MEG-1) e monócitos (linhagem THP-1) após infecção *in vitro* com MOI 1 do CHIKV ou MAYV. Amostras das células (lisados) e dos sobrenadantes da cultura foram coletadas 3, 12, 24 e 48 horas após a inoculação viral. A) Linfócitos T CD4⁺ (A30-1) infectados com CHIKV. B) Linfócitos T CD4⁺ (A30-1) infectados com MAYV evidenciando diferença significativa na elevação do RNA viral nos tempos de 3h e 24 horas ($P=0.02$). C) Megacariócitos (MEG-1) infectados com CHIKV. D) Megacariócitos (MEG-1) infectados com MAYV. E) Monócitos (THP-1) infectados com CHIKV. F) Monócitos (THP-1) infectados com MAYV intracelular ($P= 0.01$) e sobrenadante ($P= 0.02$). * diferença estatisticamente significativa.

Finalmente, as infecções por CHIKV e MAYV foram avaliadas por IFA. Proteínas antigênicas virais foram observadas no citoplasma das células 48 horas pós-infecção, para ambos os vírus, confirmando a infecção de linfócitos CD4⁺ (A30-1) infectados com CHIKV, como mostram as **Figuras. 15 A e B** e os infectados com MAYV, como mostram as **Figuras. 15 C e D**. Antígenos virais também foram observados nos citoplasmas de megacariócitos (MEG-1) infectados com CHIKV, como mostram as **Figuras. 15 E e F** e

com MAYV, como mostram as **Figuras 15. G e H**. Ainda, os citoplasmas de monócitos infectados evidenciaram antígenos de CHIKV, como mostram as **Figuras 15. I e J** e de MAYV, como mostram as **Figuras 15. K e L**.

Figura 15: Imunofluorescência indireta de linfócitos TCD4⁺ (linhagem A30-1), megacariócitos (linhagem MEG-1) e monócitos (linhagem THP-1) após infecção *in vitro* com MOI 1 de CHIKV ou MAYV, 48 horas pós-inoculação. Em azul observam-se núcleos celulares marcados com DAPI, em verde os soros murinos anti-CHIKV e anti-MAYV. A) controle negativo de linfócitos TCD4⁺ (A30-1) B) Linfócitos infectados com CHIKV C) controle negativo de linfócitos TCD4⁺ (A30-1). D) Linfócitos infectados com MAYV E) controle negativo de megacariócitos MEG-1. F) Megacariócitos infectados com CHIKV. G) controle negativo de megacariócitos. H) Megacariócitos infectados com MAYV I) controle negativo de monócitos (THP-1). J) Monócitos infectados com CHIKV K) controle negativo de monócitos. L) Monócitos infectados com MAYV. Aumento da objetiva 40x. *Setas indicam células com fluorescência verde indicando infecção viral.

A infecção por CHIKV e MAYV das linhagens celulares contínuas de células do sangue linfócitos TCD4⁺ (A30-1), megacariócitos (MEG-1) e monócitos (THP-1), analisando-se amostras do meio de cultivo que refletem a produção viral e de lisados celulares, bem como a presença de antígenos virais que refletem a produção nos citoplasmas ao longo do tempo pós-infecção, permitiu fazer inferências sobre a cinética da replicação de CHIKV e MAYV nestas células. Com base na presença viral infectante e nos teores de RNA, bem como no de antígenos no citoplasma, observou-se que as 3

linhagens celulares podem ser infectadas com CHIKV e MAYV e que estas infecções resultam em replicação viral.

As observações de linhagens contínuas de células do sangue mostram que linfócitos, megacariócitos e monócitos infectam-se com CHIKV e MAYV. Essas infecções reiteram a provável participação de células do sangue na manutenção e propagação destes vírus, na infecção natural.

DISCUSSÃO

8. DISCUSSÃO

Os arbovírus são responsáveis por surtos de doenças que podem ser graves ou debilitantes, com impacto significativo na saúde humana no Brasil e no mundo, tornando importante o estudo de suas transmissibilidades por transfusão sanguínea, em especial, em momentos de surto ou epidemia. As regras que norteiam a doação de sangue em todo o mundo não preveem e, portanto, dão vulnerabilidade a transmissão de arbovírus, considerando principalmente o alto número de portadores assintomáticos destes microorganismos, aproximadamente 200 milhões/ano, que podem ser doadores (STRAMER et al., 2007).

Portanto, está claramente justificada a necessidade de estudar arbovírus e suas infecções em doadores de sangue, incluindo avaliações sobre a capacidade desses vírus se manterem viáveis em hemocomponentes após seu processamento e armazenamento, por muitos dias. Entre os arbovírus, focando o objeto deste trabalho, os *Alphavirus*, Chikungunya e Mayaro, apesar de não serem altamente letais, após produzirem doenças febris agudas, podem ser causadores de doenças articulares dolorosas e incapacitantes que perduram por meses, ou até anos (LEWTHWAITE et al. 2009). Embora a transmissão de alguns poucos arbovírus em transfusão de sangue seja reconhecida, como a dos vírus do dengue, pouco se conhece em relação a este tipo de transmissão por vírus Chikungunya e Mayaro, ou ainda, se permanecem infecciosos nos hemoderivados. Habitualmente, CHIKV e MAYV adentram o organismo humano inoculados no tecido subcutâneo, pelo mosquito vetor durante seu repasto. Em seguida, por via linfo-hematogênica, os vírus infectam fagócitos e replicam nos órgãos linfoides, o que inclui linfonodos e baço, se espalhando pela corrente sanguínea e, assim, atingindo órgãos-alvo e produzindo manifestações clínicas (MATUSALI et al., 2019).

As medidas habituais que visam reduzir o risco de transmissão viral por transfusão de hemoderivados incluem: triagem para obtenção de informações clínico-epidemiológicas que permitam a exclusão de doadores potencialmente infectados, detecção de anticorpos contra os vírus e/ou pesquisa de ácidos nucleicos (NAT) virais nas bolsas de sangue doadas. Tais medidas são especialmente importantes em períodos de surto. Entretanto, reconhecendo o escasso conhecimento sobre a permanência de CHIKV e MAYV em sangue doado, principalmente após o processamento e armazenamento dos hemoderivados, decidiu-se estudar tais viroses. Este trabalho visa fornecer informações

que justifiquem e embasem a tomada de medidas redutoras do risco da transmissão desses agentes infecciosos por transfusão de produtos do sangue. Dessa forma, aprimora-se a segurança transfusional.

Entre 2005 e 2007, CHIKV causou uma enorme epidemia nas Ilhas do Oceano Índico, o que levou uma grande preocupação entre os serviços de sangue franceses quanto à possibilidade de sua transmissão via hemoderivados. Assim, a partir de 23 de janeiro de 2006, a doação de sangue foi interrompida, permanecendo apenas a doação de plaquetas nas quais a triagem sistemática do genoma do CHIKV foi realizada pelo teste de ácido de nucléico - NAT. (BROUARD et al. 2008).

Um estudo realizado por nosso grupo de pesquisa entre 2017-2018, com 5608 amostras de doadores de sangue da cidade de São Carlos, revelaram 8 indivíduos com anticorpos IgM-positivos contra CHIKV (0,14%). Estas são infecções recentes por vírus Chikungunya que colocam em risco a segurança transfusional. Neste estudo, os doadores não apresentaram IgG contra CHIKV (ROMEIRO et al., 2020). Da mesma forma, dois estudos com amostras de doadores de sangue, em Ribeirão Preto, também, não observaram IgG contra CHIKV em doadores de sangue (NETTO et al. 2017; SLAVOV et al. 2017). Quanto ao vírus Mayaro, Romeiro e colaboradores (2020), no mesmo trabalho referido acima, observaram anticorpos IgM-específicos contra MAYV nos sangues de 36 doadores (0,64% de positividade), indicando infecção recente. Ainda, 11 doadores apresentaram IgG contra MAYV. Ressalta-se que as amostras séricas positivas para MAYV foram testadas por neutralização e não apresentaram reação cruzada com CHIKV (ROMEIRO et al., 2020). Tal achado sugere a circulação do vírus Mayaro na região de São Carlos, em São Paulo, o estado mais populoso do país, localizado no Sudeste e, portanto, a uma longa distância dos locais onde costumam ocorrer casos de Mayaro, na Região Amazônica e no Planalto Central brasileiros. Tais achados motivaram a inclusão do vírus Mayaro no presente estudo.

Com relação aos estudos prévios de Chikungunya em hemocomponentes, Chiu e colaboradores (2015) mostraram que doadores assintomáticos apresentavam genoma de CHIKV no sangue em título de até $9,1 \times 10^7$ cópias/mL. A maioria dos casos exibia títulos de CHIKV similares aos observados anteriormente em pacientes com febre do Chikungunya ($5,6 \times 10^5$ PFU/mL, ou $\approx 5.6 \times 10^7$ cópias do RNA viral / mL). A viremia do Dengue em pacientes também pode produzir 10^5 a 10^9 cópias do RNA viral / mL (CHEN & WILSON, 2005). Mohammed e colaboradores (2008), estudando sangue de doadores

saudáveis, encontraram cargas de CHIKV da ordem de 2×10^3 a 8×10^7 cópias / mL. Por outro lado, estudos analisaram a frequência com que indivíduos assintomáticos ou com infecção subclínica por CHIKV doam sangue. Observaram percentuais extremamente variados, 0,77 a 87%, dependendo da população estudada (OOI et al., 2006).

Na primeira parte do presente trabalho, inocularam-se com MAYV e CHIKV bolsas de sangue doado em teores virais similares aos observados em indivíduos infectados assintomáticos. As bolsas de sangue infectadas foram processadas de maneira igual às utilizadas nas rotinas de banco de sangue, sendo que, para a infecção, foram mantidas sob agitação constante por 12 ou 24h. Os hemocomponentes também foram obtidos destas bolsas e armazenados sob condições-padrão. Para a análise dos hemocomponentes, os concentrados de plaquetas mantidos a temperatura ambiente por 5 dias, tiveram coletas amostrais diárias. As quantificações virais em *plaques*, também confirmadas por teores de RNA viral, mostraram CHIKV e MAYV infecciosos e em teores infectantes para eventuais receptores destes concentrados de plaquetas. Tal resultado é relevante considerando o que ocorre com outros arbovírus. As plaquetas são carreadoras e importantes participantes na patogênese do Dengue (SIMON et al., 2015). Também observou-se que os vírus influenza são carregados por plaquetas na circulação e o vírus da hepatite C (HCV) é transportado protegido nas plaquetas para alcançar o fígado (ASSINGER, 2014). Nossos resultados sugerem que as plaquetas devem carrear e espalhar CHIKV e MAYV pelo organismo.

Os concentrados de hemácias oriundos das bolsas infectadas com CHIKV e MAYV foram mantidos por 35 dias, a 4°C, com coletas amostrais com intervalos de 7 dias. Nesses concentrados, independentemente da origem, em bolsas mantidas por 12 ou 24h, também observou-se MAYV e CHIKV infecciosos e em títulos potencialmente infectantes para pacientes receptores destes hemoderivados. Poucos estudos indicam um envolvimento fisiopatológico das hemácias em infecções arbovíricas, diferentemente das plaquetas com vírus do Dengue (SIMON et al., 2015). Deste modo, foi surpreendente observar a persistência e o número de cópias do RNA genômico de CHIKV e MAYV nos concentrados de hemácias. Embora as hemácias não tenham a capacidade de traduzir o mRNA, outros autores observaram evidências de replicação viral DENV em concentrado de hemácias, provavelmente infectando glóbulos brancos residuais presentes no hemoderivado (SHUTERLAND et al., 2016). Ainda, chamou atenção que os plasmas frescos oriundos das bolsas infectadas com CHIKV e MAYV, após congelamento por 8

meses, independentemente de um descongelamento por 24 horas, exibiram vírus infectantes e em teores suficientes para contaminarem eventuais receptores daqueles plasmas frescos.

Em suma, os resultados do presente trabalho mostram claramente que os 3 hemoderivados oriundos de bolsas de sangue inoculadas com CHIKV e MAYV mantêm vírus infecciosos em níveis potencialmente capazes de infectar os receptores destes hemoderivados, mesmo após o armazenamento nas condições indicadas. Realmente, CHIKV e MAYV mantiveram-se presentes e infectantes mesmo após os tempos máximos de armazenamento preconizados para estes hemoderivados. Nossos achados contrastam com a ausência de medidas preconizadas pelas instituições de saúde que visam a identificar esses vírus em hemocomponentes. Nesse sentido, ações que permitam diagnosticar Mayaro, Chikungunya e outros arbovírus, seriam de grande utilidade.

Nos Estados Unidos e Canadá, o *Transfusion Transmitted Diseases committee* (AABB's) instituiu um projeto para identificar agentes emergentes de doenças infecciosas conhecidos ou suspeitos de serem transmitidas por transfusão, para os quais não havia intervenção implementada (STRAMER et al., 2009). Naqueles países, listou-se 69 patógenos que foram categorizados em três níveis de relevância. Esta lista de agentes infecciosos inclui vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da imunodeficiência humana (HIV-1/2), vírus linfotrópicos de células T humanas (HTLV-I / II), citomegalovírus (CMV), Parvovírus B19, vírus do Nilo Ocidental (WNV), entre outros. Assim, com testes laboratoriais das bolsas doadas buscando pela contaminação por estes vírus, evita-se que os hemoderivados oriundos sejam transfundidos, impedindo a transmissão (MINISTÉRIO DA SAÚDE et al., 2012).

Conhecendo os altos níveis de infecções assintomáticas por CHIKV em indivíduos que poderiam ser eventuais doadores de sangue, os resultados do presente trabalho têm implicações importantes, particularmente em áreas endêmicas do CHIKV, mas também, naquelas onde circula o MAYV. Tais fatos precisam ser considerados e acrescidos às outras preocupações infecciosas na medicina transfusional (APPASSAKIJ et al., 2013).

Após constatar que CHIKV e MAYV são transmissíveis por hemoderivados e sabendo que os produtos obtidos após processamento do sangue não são livres de leucócitos, realizamos a segunda parte do trabalho. Assim, pesquisou-se a infecção por estes vírus em leucócitos sanguíneos.

Derivados de hemocomponentes podem conter quantidades aceitáveis destas células, como previsto nas legislações que incluem a Portaria de Consolidação nº 04 RDC nº34 (BRASIL, 2014):

- Concentrado de hemácias - nº plaquetas na unidade $2,0 \times 10^{10}$ e nº leucócitos na unidade $2,2 \times 10^9$
- Concentrados de plaquetas: nº plaquetas na unidade deve ser $\geq 5,5 \times 10^{10}$ e nº leucócitos na unidade deve ser $< 2,0 \times 10^8$

Para esta avaliação, utilizou-se o sangue de voluntários saudáveis, que foi infectado por CHIKV ou MAYV e teve separados o PBMC. Estas células foram fenotipadas para serem especificamente reconhecidas quando infectadas. Assim, utilizando a técnica de imunofluorescência, observou-se que CHIKV e MAYV infectam as células mononucleares, os linfócitos B ($CD19^+ CD20^+$) e os linfócitos T ($CD3^+$ e $CD4^+$). Observou-se, ainda, que MAYV infecta monócitos ($CD14^+$) e CHIKV infecta macrófagos ($CD68^+$) do sangue periférico. Tais resultados evidenciam que a disseminação viral no organismo de pessoas infectadas com MAYV e CHIKV deve ocorrer nestas células leucocitárias do sangue, as quais também, são produtores de múltiplas citocinas, como TNF, IL2, IL6, TGF- β e outras, com implicações na fisiopatologia e na clínica dos pacientes com febre do Chikungunya e febre do Mayaro. Sabe-se que, na infecção natural por CHIKV, o número e a variedade de células infectadas abrangem aquelas da linhagem mononuclear e polimorfonucleares (GUZMAN et al., 2016; JOHNSTON; HALLIDAY; KING, 2000; MAROVICH et al., 2001). Inclusive, há evidências de que vírus manipulariam monócitos/macrófagos utilizando-os como repositório que favoreceriam a disseminação e promoveriam persistência viral a longo prazo dentro de tecidos infectados (SIMON et al., 2010). Ainda, Her e colaboradores (2010), em experimentos com sangue total, observaram células B e dentriticas mielóides infectadas por CHIKV, mostrando que estas são suscetíveis ao vírus, o que é corroborado pelos resultados do presente estudo. Com relação a outros arbovírus, sabe-se que os leucócitos e concentrados de plaquetas são alvo primário para a replicação de DENV-3 e DENV-1 (SIMON et al., 2015).

No presente estudo, curiosamente, observou-se que neutrófilos do sangue periférico não se infectaram por MAYV ou CHIKV. Há poucos estudos mostrando o papel dos neutrófilos nestas infecções. Hiroki e colaboradores (2018) demonstraram, pela

primeira vez, que CHIKV é capaz de induzir a liberação de NETs (Neutrophil Extracellular Traps) em neutrófilos murinos e humanos após incubação de 4h, ou seja, pacientes em fase aguda possuem maiores níveis plasmáticos de NET, o que foi correlacionado a maior carga viral. Correlacionando com o presente trabalho, pode-se interpretar que a incubação de 24h pode ter ativado os neutrófilos a produzirem NETs, que possivelmente inativaram o vírus, o que foi observado em nossos resultados.

Quanto à infecção por CHIKV e MAYV, nosso estudo mostrou infecção de leucócitos, com exceção dos neutrófilos, de PBMC de doador saudável. Diversos estudos indicam a possibilidade de infecção destes tipos celulares, que podem funcionar como veículo de transmissão viral em bolsas de sangue, como já mostrado para o vírus Dengue (OH, 2015; LEVI, 2016; LIU, 2019).

É importante lembrar, ainda, que em bancos de sangue as bolsas podem passar por processo de leucorredução, técnica de filtragem especial utilizada para redução destes tipos celulares nos hemocomponentes. Este processo pode reduzir a disponibilidade de vírus, reduzindo o número de células infectadas, como mostrado por Qu e colaboradores (2009), em que os hemocomponentes apresentavam-se negativos para Vírus Epstein-Barr (EBV), após leucorredução. Dessa forma, redução do número de leucócitos pode reduzir a possibilidade de infecção, apesar de trabalhos já terem apresentado hemocomponente infectado após este processamento (SMATTI et al., 2018). Estes resultados reforçam a possibilidade de leucócitos infectados manterem a disponibilidade de vírus viável, funcionando como veículos para infecção por transfusão sanguínea.

Sabendo que todos os hemocomponentes avaliados apresentam vírus infectivos e que a avaliação de PBMC mostrou-se susceptível a infecção por estes mesmos vírus, realizamos a terceira parte deste trabalho.

Assim, linhagens contínuas de linfócitos TCD4⁺ (A30-1), megacariócitos (MEG-1) e monócitos (THP-1) foram inoculadas com CHIKV e MAYV. Quando avaliadas qualitativamente por imunofluorescência as infecções por CHIKV e MAYV puderam ser confirmadas nestas células até 48 horas pós-inoculação, com base nos antígenos virais citoplasmáticos. As infecções por CHIKV e MAYV também foram analisadas temporalmente, com base em amostras dos sobrenadantes das culturas inoculadas (que representam o extracelular) e lisados de células (que refletem o conteúdo viral intracelular). Observou-se para todas as linhagens celulares que, amostras colhidas em

todos os tempos após a inoculação apresentavam CHIKV e MAYV no intracelular e no extracelular, o que permitiu inferir sobre cinéticas da replicação destes patógenos. Nos linfócitos TCD4⁺, CHIKV e MAYV estavam presentes em amostras obtidas 3h e 12h pós-infecção, com posterior queda dos títulos virais em 24 e 48h pós-infecção, o que se mostrou significativamente mais evidente para MAYV (p 0,03). Observou-se aumento significativo (p 0,007) nos teores de MAYV, com elevação de aproximadamente 10² PFU/mL, 24 e 48h pós-infecção. Nos megacariócitos observou-se 10³ PFU/mL de CHIKV em todas as amostras e um aumento viral significativo (p 0.01) no extracelular, atingindo 10⁴ PFU/mL. Ressalta-se, portanto, que houve permissividade significativa à infecção por CHIKV (p 0.04) no intracelular dos megacariócitos. Resultados similares foram observados com os megacariócitos infectados por MAYV. Notou-se que os títulos de MAYV elevaram-se significativamente (p 0,10) entre 3 e 12h pós-infecção, atingindo 10³ PFU/mL e, assim, mantendo-se nos tempos subsequentes. Quanto aos monócitos infectados com MAYV e CHIKV, observaram-se títulos virais mais elevados que nas outras linhagens celulares. Os teores de CHIKV elevaram-se no intracelular entre 12 e 24h pós-infecção, atingindo 10⁴ PFU/mL, com subsequente redução a 10² PFU/mL em 48h. No extracelular, observou-se 10⁵ PFU/mL de CHIKV em 24h e uma redução para 10⁴ PFU/mL em 48h pós-inoculação. Com relação ao MAYV infectando monócitos, pôde-se observar aumento progressivo significativo (p 0,001) dos títulos virais intracelulares, atingindo 10⁵ PFU/mL 48h pós-infecção. No extracelular, observou-se elevação significativa de títulos virais de 3 a 12h pós-inoculação (p 0,001), onde tal título atingiu 10⁵ PFU/mL, seguindo-se por decréscimo a 10³ PFU/mL em 24h e 48h pós-inoculação. Portanto, com base em antígenos virais citoplasmáticos na presença viral infectante e nos teores de RNA, constatou-se que linfócitos TCD4⁺, megacariócitos e monócitos humanos se infectam com CHIKV e MAYV, sendo que estas infecções resultam em relevante replicação viral.

A queda de título viral após 24 horas nos linfócitos infectados sugere uma permissividade mais restrita que aquela observada em megacariócitos. Sabe-se que megacariócitos e células precursoras transferem para as plaquetas elementos do aparelho de Golgi, local de montagem e maturação dos Alphavírus (WANDAL et al., 2012; BROWN & HERNANDEZ, 2012), sugerindo que ocorra produção de viral pelas plaquetas, como já foi observado para DENV (SIMON et al., 2015). Na literatura não há

relatos que abordam unicamente a cinética de replicação *in vitro* dos Alphavirus em células do sangue.

Os resultados do presente estudo sugerem que leucócitos do sangue podem ser reservatórios onde proliferam CHIKV e MAYV, inclusive durante o armazenamento dos hemocomponentes. Esses achados levantam a hipótese de que outros vírus de RNA, ao infectar as mesmas células, poderiam ser disseminados durante o armazenamento de hemocomponentes.

Ao final, importa ressaltar que esse é o primeiro estudo a evidenciar a infecciosidade dos *Alphavirus* Chikungunya e Mayaro em concentrado de hemácia, plaquetas e plasma fresco congelado em condições de armazenamento de bancos de sangue. O trabalho também coloca os leucócitos como células associadas à manutenção desses vírus. A possibilidade de que CHIKV e MAYV, como pode ocorrer com outros vírus de RNA, possam persistir e inclusive replicar nos produtos sanguíneos celulares, destaca a necessidade de se acelerar o desenvolvimento e a implementação de testes moleculares e sorológicos diagnósticos destes vírus na rotina de bancos de sangue, ou a implementação de métodos rotineiros para a inativação universal destes patógenos.

Focando o aspecto da segurança transfusional prevenindo infecções por MAYV e CHIKV, deve-se reforçar a necessidade do desenvolvimento e uso de testes para diagnosticar estes patógenos no sangue doado.

CONCLUSÃO

9. CONCLUSÃO

- Bolsas de sangue doado inoculadas com os *Alphavirus* Mayaro ou Chikungunya, mantêm ambos os vírus infectantes durante o processamento dos hemoderivados (concentrado de hemácias, concentrado de plaquetas e plasma) e após o armazenamento específico recomendado para cada produto, sendo capazes de infectar indivíduos com eles transfundidos.
- Os *Alphavirus* Mayaro e Chikungunya infectam linfócitos B (CD19⁺ CD20⁺) e linfócitos T (CD3⁺ e CD4⁺) e, ainda, Mayaro infecta monócitos (CD14⁺) e Chikungunya infecta macrófagos (CD68⁺) do sangue periférico, podendo ser disseminados por estas células em pacientes.
- Os *Alphavirus* Mayaro e Chikungunya infectam culturas celulares de linfócitos TCD4⁺, megacariócitos e monócitos humanos, produzindo relevantes replicações virais com possíveis repercussões na fisiopatologia das doenças por estes vírus.

REFERÊNCIAS

10. REFERÊNCIAS

ABAD-FRANCH, F. et al. Mayaro virus infection in amazonia: a multimodel inference approach to risk factor assessment. **PLoS Negl Trop Dis**, v. 6, n. 10, p. e1846, 2012.

ALPHAVÍRUS, 2017. Disponível em: http://viralzone.expasy.org/625?outline=all_by_species. Acessado em: 29/03/2020

APPASSAKIJ. et al. Viremic profiles in asymptomatic and symptomatic chikungunya fever: a blood transfusion threat? **Transufion**. v. 53, Out. 2018

ASSINGER, A. et al. Platelets and infection – an emerging role of platelets in viral infection. **Frontiers Immunology**. V. 5, n, p 8, 2014.

AZEVEDO, R. S. et al. Mayaro fever virus, Brazilian Amazon. **Emerg Infect Dis**, v. 15, n. 11, p. 1830-2, Nov. 2009.

AZEVEDO, R. S. S., OLIVEIRA, C. S., VASCONCELOS, P. F. C. "Risco do chikungunya para o Brasil". **Rev. Saúde Pública**, v. 49, p 58, Set. 2015.

AZEVEDO, R. S.; NUMES, M. R.; CHIANG, et al. Reemergence of Oropouche fever, northern Brazil. **Emerg. Infect. Dis.**, v.13, n.6, p. 9125, 2007.

BARJAS-CASTRO, M. L. et al. Probable transfusion-transmitted Zika virus in Brazil. **Transfusion**, v. 56, p. 1684-1688, 2016.

BEATTY M. E et al. Risk of transmission of dengue through blood transfusion in Puerto Rico. Presented at The 5th International Conference on Emerging Infectious Diseases. **Atlanta**, GA. Marc. 2006.

BLANCOU, J. et al. Emerging or re-emerging bacterial zoonoses: factors of emergence, surveillance and control. **EDP Sciences**. 36 507–522, 2005.

BRASIL, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA - RDC Nº 34, DE 11 DE JUNHO DE 2014. Disponível em: http://portal.anvisa.gov.br/documents/10181/2867975/RDC_34_2014_COMP.pdf/283a192e-eee8-42cc-8f06-b5e5597b16bd?version=1.0 Acesso em 20 de março de 2019.

BRASIL, RESOLUÇÃO DA DIRETORIA COLEGIADA – RDC Nº 57, 16 DE DEZEMBRO DE 2010. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/anvisa/2010/res0057_16_12_2010.html. Acesso em 20 março 2019.

BRASIL. Ministério da Saúde. Caderno de informação [recurso eletrônico]: sangue e hemoderivados: produção hemoterápica: Sistema Único de Saúde – SUS (serviços

públicos e privados contratados): serviços privados não contratados pelo SUS. Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde, Coordenação-Geral de Sangue e Hemoderivados. – 5. ed. – Brasília : Ministério da Saúde, 2011

BRASIL. Portaria MS nº 1.353, de 13.06.2011. Aprova o Regulamento Técnico de Procedimentos Hemoterápicos. - DOU 1 de 14.06.2011. http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2011/prt1353_13_06_2011.html. Acessado em 28/04/2019.

BROUARD, et al. "Estimated risk of Chikungunya viremic blood donation during an epidemic on Reunion Island in the Indian Ocean, 2005 to 2007." **Transfusion**, v. 48(7), p. 1333-41, Feb. 2008.

BROWN, D. T; HERNANDEZ. Infection of cells by alphaviruses **Viral Molecular Machines**. Advances in Experimental Medicine and Biology., R. 2012

BRUININI, et al. High Frequency of Mayaro Virus IgM among Febrile Patients, Central Brazil, **Emerg. Infect. Dis.** 23 (6), 1025. 2017

CASSADO, S., et al., Emergence of chikungunya fever on the French side of Saint Martin Island, Dec. 2014.

CHEN L, WILSON M, E. Non-vector transmission of dengue and other mosquito borne flaviviruses. **Dengue Bulletin**. 2005; 29:18–31. Vol. 29, No. 8, Aug. 2015

CHIU Y. C et. Genomic Assays for Identification of Chikungunya Virus in Blood Donors, Puerto Rico, 2014. Rev. **Emerging Infectious Diseases**. Vol. 21, No. 8, 2015

CHIU Y. CHARLES, GUIXIA B. V, YU, D, NACCACHE, S. N, LEE, D., LINNEN, J. P. J. M E STRAMMR, S. L. Genomic Assays for Identification of Chikungunya Virus in Blood Donors. **Emerging Infectious Diseases**. Vol 21, Puerto Rico, 2014

CHO, B; J, Kim; B, Jeon; J, Noh; J, Kim; M, Park; S, Park. Expression and Evaluation of Chikungunya Virus E1 and E2 Envelope Proteins for Serodiagnosis of Chikungunya Virus Infection. **Journal of virologist**. V. 154, Ed. 1-2. pg. 154-159. 2008.

CHRISTOU, L. The global burden of bacterial and viral zoonotic infections. **Clin Microbiol Infect**, v. 17, n. 3, p. 326-30, Mar 2011.

CIOFFI, J. G. M.; NEVES, M. S. A. Processamento, Armazenamento e Distribuição do Sangue Coletado. In: BORDIN, O.; LANGHI, D. M.; COVAS, D. T. **Hemoterapia: Fundamentos e Prática**. São Paulo: Atheneu, 2007.

CRUZ, A.C.R., et al. Vigilância sorológica para arbovírus em Juruti, Pará, Brasil **Cadernos de Saúde Pública, Rio de Janeiro**, v. 25(11), p. 2517-2523, Nov. 2009.

DIAS LL, AMARILLA AA, POLONI TR, et al. Detection of dengue virus in sera of Brazilian blood donors. **Transfusion**, v. 52(8), p.1667-71, Aug. 2012.

DUTTA S. K., et al. Copy number variation of Chikungunya ECSA virus with disease symptoms among Indian patients. **J Med Virol**, v. 86(8), p. 1386-92, Aug. 2014

EPIDEMIOLOGICAL ALERT. Neurological syndrome, congenital malformations, and Zika virus infection. Implications for public health in the Americas. 2015 Disponível em: <https://www.paho.org/hq/dmdocuments/2015/2015-dec-1-cha-epi-alert-zika-neuro-syndrome.pdf>. acessado em 23/03/2019.

ESPOSITO, D. L. A, FONSECA, B. A. L. Sensitivity and detection of chikungunya viral genetic material using several PCR-based. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 50(4), p. 465-469, July-August, 2017.

FARIA, N. R, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. **Science Reports**. V 361. August 2018

FARIA, N. R, et al. Zika virus in the Americas: Early epidemiological and genetic findings. **Science Reports**. V 352. April, 2016

FAUQUET C. M, et al. Virus Taxonomy: Classification and Nomenclature of Viruses; Eighth Report of the International Committee on Taxonomy of Viruses. **Elsevier Academic Press**, San Diego, CA, USA, 2005.

FIGUEIREDO, L. T. M Uso de células e Aedes Albopictus C6/36 na propagação e classificação de arbovírus das famílias togaviridae, flaviviridae, bunyaviridae e rhabdoviridae. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**. 1990.

FIGUEIREDO, L. T. M. Os Arbovirus do Brasil. Anais da Segunda Reunião Anual da Sociedade Brasileira de Pesquisadores Nikkeis, Sessão III- Virologia, São Paulo, 16 de agosto de 1994, p. 45-58, 1994.

FIGUEIREDO, L. T. The Brazilian flaviviruses. **Microbes Infect**, v. 2, n. 13, p. 1643-9, Nov 2000.

_____. Emergent arboviruses in Brazil. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 40, n. 2, p. 224-9, Mar-Apr 2007.

_____. Emerging alphaviruses in the Americas: Chikungunya and Mayaro. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.47 no.6 Nov./Dec. 2014

_____. Large outbreaks of Chikungunya virus in Brazil reveal uncommon clinical features and fatalities . **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.** vol.50 no. 2017

CHIKUNGUNYA: Fact sheet n° 327. July 2016b. **WORLD HEALTH ORGANIZATION.** Disponível em <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs327/en/>. Acessado em 03/09/2019.

FRANCIS, R. O. et al. West Nile virus infection in blood donors in the New York City area during the 2010 seasonal epidemic. **Transfusion**, v. 52, n. 12, p. 2664-70, Dec 2012.

GAIBANI, P. et al. Detection of Usutu-virus-specific IgG in blood donors from northern Italy. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 12, n. 5, p. 431-3, May 2012.

GALLIAN, P. et al. Prospective detection of chikungunya virus in blood donors, Caribbean 2014. **Blood**, v. 123, n. 23, p. 3679-81, Jun 5 2014.

GRIFFIN, D. E. Alphaviruses. In: KNIPE, D. M. H., P.M. (Ed.). **Fields Virology**. Philadelphia, USA: Wolters Kluwer Health, v.2, p.2502-2601, 2007.

GUZMAN, M. G. et al. Dengue infection. **Nature reviews Disease primers**, v. 2, p. 16055, 2016

HALSEY, E. S. et al. Mayaro virus infection, Amazon Basin region, Peru, 2010-2013. **Emerg Infect Dis**, v. 19, n. 11, p. 1839-42, Nov 2013.

HARRINGTON, T., et al.. West Nile virus infections transmitted by blood transfusion. **Transfusion**, v.43, p.18-22, 2003.

HASSING, R. J. et al. Imported Mayaro virus infection in the Netherlands. **J Infect**, v. 61, n. 4, p. 343-5, Oct 2010.

HER, Z. et al. Active infection of human blood monocytes by Chikungunya virus triggers an innate immune response. **J Immunol**, v. 184(10), p. 5903–5913, 2010.

HIROKI, C. H. Papel das Neutrophil Extracellular Traps no controle da infecção por Chikungunya.159 f. **Dissertação (Mestrado em Imunologia Básica e Aplicada)** – Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, Dept. Bioquímica e Imunologia. Universidade de São Paulo, 2018

HUBALEK, Z.; RUDOLF, I. Tick-borne viruses in Europe. **Parasitol Res**, v. 111, n. 1, p. 9-36, Jul 2012.

INTERNATIONAL-SOCIETY-FOR-INFECTIOUS-DISEASES. Chikungunya in America. Brookline, USA 2014.

JOHNSTON, L. J.; HALLIDAY, G. M.; KING, N. J. C. Langerhans cells migrate to local lymph nodes following cutaneous infection with an arbovirus. **Journal of Investigative Dermatology**, v. 114, n. 3, p. 560–568, 2000.

JONES, K. E. et al. Global trends in emerging infectious diseases. **Nature**, v. 451, n. 7181, p. 990-3, Feb 2008.

JOSE, J.; SNYDER, J. E.; KUHN, R. J. A structural and functional perspective of alphavirus replication and assembly. **Future Microbiol**, v. 4, n. 7, p. 837-56, Sep 2009.

KAUR, P. *et al.* Infectious viral quantification of Chikungunya virus – Virus plaque assay. **Chikungunya virus: methods and protocols, methods in molecular biology**, chapter 9, v.1426, p. 93-103, 2016.

KHAN, A. H. et al., Complete nucleotide sequence of chikungunya virus and evidence for an internal polyadenylation site. **J Gen Virol**, 83 (Pt 12): p. 3075-84, 2002.

LEAROYD, P. The history of blood transfusion prior to the 20th century - **Part 1. Transfusion Medicine, London**, v. 22, p. 308-314, 2012

LÉLIS, A. R. A.; PINHEIRO, R. F. Manual de Hemotransusão. Fortaleza: HUWC/UFC, 27 p. 2007

LEUNG, J. Y.; NG, M. M.; CHU, J. J. Replication of alphaviruses: a review on the entry process of alphaviruses into cells. **Adv Virol**, v. 2011, p. 249640, Jul. 2011.

LEVI, J. E. Dengue Virus and Blood Transfusion. **The Journal of Infectious Diseases**, v 213, p 689–690, 2016

LEVI, J. E. et al. Real-time symptomatic case of transfusion-transmitted dengue. **Transfusion**, v. 55, n. 5, p. 961-964, 2014.

LEWTHWAITE, P., R. et al. Chikungunya virus and central nervous system infections in children, India. **Emerg Infect Dis**, v. 15(2), p. 329-31, Feb 2009

LIMA, T. N; Arboviroses emergentes e novos desafios para a saúde pública no Brasil, **Rev Saúde Pública**, v. 50:36 2016.

LIU, R, et al. Prevalence of Zika virus in blood donations: a systematic review and meta-analysis. **BMC Infectious Diseases**, v. 19:590. 2019.

MASCHERETTI, M. et al. Yellow fever: reemerging in the state of Sao Paulo, Brazil, 2009. **Rev Saude Publica**, v. 47, n. 5, p. 881-9, Oct 2013.

MATUSALI et al. Review: Tropism of the Chikungunya Virus. **Rev. Viruses** 11, 175, 2019.

MESLIN, F. X. Global aspects of emerging and potential zoonoses: a WHO perspective. **Emerg Infect Dis**, v. 3, n. 2, p. 223-8, Apr-Jun 1997.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. 2020. Boletim Epidemiológico: 1 a 23 de 2020. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/images/pdf/2020/June/16/Boletim-epidemiologico-SVS-24-final.pdf>. Acesso em 26 de junho 2020

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Manual Técnico para Investigação da Transmissão de Doenças pelo Sangue. 2015. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/manual_tecnico_transmissao_doencas_sanguine.pdf. Acesso em 24 de abril de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e doença aguda pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 52 de 2018. <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/2019-002.pdf>. Acesso em 5 de março de 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento dos casos de dengue, febre de chikungunya e febre pelo vírus Zika até a Semana Epidemiológica 45. Boletim Epidemiológico, v. 46, n. 36, 2015

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Segurança Transfusional: um olhar sobre os serviços de hemoterapia das regiões Norte e Centro-Oeste do Brasil. 2012. http://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/seguranca_transfusional_hemoterapia_centro_oeste_norte_brasil.pdf. Acesso em 27 abril 2019

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Vírus Zika no Brasil A resposta do SUS 2015. https://bvsmis.saude.gov.br/bvs/publicacoes/virus_zika_brasil_resposta_sus.pdf. Acesso em 24 de abril 2019.

MOHAMMED, H., et al. Dengue virus in blood donations, Puerto Rico, 2005. **Transfusion**, v.48, p.1348–1354, 2008.

MOTA, M. T. O. Mosquito-transmitted viruses: the great Brazilian challenge. **Brazilian Journal of Microbiology**, 2016

MOTA, M. T. O., et al., Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**, v. 10(9), p. 1109–1122, 2015

MOURAO, M. P. et al. Mayaro fever in the city of Manaus, Brazil, 2007-2008. **Vector Borne Zoonotic Dis**, v. 12, n. 1, p. 42-6, Jan 2012.

MOURAO, M.P., et al. Oropouche Fever Outbreak, Manaus, Brazil, 2007-2008. **Emerging Infectious Disease**. v. 15(12):p. 2063- 2064, 2009.

NAPOLÊÃO-PEGO, P. et al. Mayaro Virus Disease. **Journal of Human Virology & Retrovirology**, v. 1, n. 3, p. 1–11, 2014.

NETTO, E. M, et al. High Zika Virus Seroprevalence in Salvador, Northeastern Brazil Limits the Potential for Further Outbreaks. **MBio**, v. 8(6), p.14, Nov 2017

NEUMAYR, A. et al. Mayaro virus infection in traveler returning from Amazon Basin, northern Peru. **Emerg Infect Dis**, v. 18, n. 4, p. 695-6, Apr 2012.

NOBEL PRIZE (ORG). The nobel prize in physiology or medicine 1930. Disponível em: http://nobelprize.org/nobel_prize/medicine/laureates/1930/index.html. Acessado em 10/04/2020

OH, H. B; et al. Bitten by a bug or a bag? Transfusion-transmitted dengue: a rare complication in the bleeding surgical patient. **Transfusion**. v. 55, 2015

OLIVEIRA, et al Mayaro virus: a neglected arbovirus of the Americas. **Future Virology**. v.10(9), 1109–1122, 2015

OOI, E.E.; GOH, K.T. & GUBLER, D.J. Dengue prevention and 35 years of vector control in Singapore. **Emerging Infectious Diseases**, v.12, p.887-893, 2006.

ORENO, E. S. et al. Reemergence of yellow fever: detection of transmission in the State of Sao Paulo, Brazil, 2008. **Rev Soc Bras Med Trop**, v. 44, n. 3, p. 290-6, May-Jun 2011.

PATY, M. -C. Expansion des arboviroses et gestion du risque transfusionnel: exemple des virus West Nile, de la dengue et du chikungunya. **Transfusion Clinique et Biologique**, v. 20,p. 165-173, 2013

PEALER, L.N.; et al. Transmission of West Nile virus through blood transfusion in the Unites States in 2002. **New England Journal of Medicine**, v.349, p.236-245, n.13, 2003.

PERKINS, H. A; BUSH, M. P. Transfusion-associated infections: 50 years of relentless challenges and remarkable progress. **Transfusion**. v. 50, 2010.

PETERSON, L. R.; BRUSCH, M. P. Transfusion-transmitted arboviruses. **Vox Sanguinis**, v. 98, p. 495–503, 2010.

PIERRO, A. et al. Detection of specific antibodies against West Nile and Usutu viruses in healthy blood donors in northern Italy, 2010-2011. **Clin Microbiol Infect**, v. 19, n. 10, p. E451-3, Oct 2013.

PINHEIRO, F. P. Situação das arboviroses na região amazônica. International Symposium on Tropical Arboviruses and Haemorrhagic Fevers, Belém. **Academia Brasileira de Ciências- Revista da FSESP**, Rio de Janeiro, p. 27-48. 1982

POWERS, A. M. et al. Genetic relationships among Mayaro and Una viruses suggest distinct patterns of transmission. **American Journal of Tropical Medicine and Hygiene**, v. 75, n. 3, p. 461–469, 2006.

QU et al., Effects of storage and leukoreduction on lymphocytes and Epstein-Barr virus genomes in platelet concentrates. **Rev Transfusion V**. 49, 2009

RECEVEUR, M. C. et al. Infection with Mayaro virus in a French traveller returning from the Amazon region, Brazil, January, 2010. **Euro Surveill**, v. 15, n. 18, May 6 2010.

RIBEIRO et al. Infection profiles of Mayaro virus and Chikungunya virus in mammalian and mosquito cell lineages. **Rev Pan-Amaz Saude**, p. :25-35, 2018

ROBINSON, M. C. An epidemic of virus disease in Southern Province, Tanganyika Territory, in 1952-53. I. **Clinical features."** **Trans R Soc Trop Med Hyg**, v. 49(1), p. 28-32, Jan 1995

ROMANO-LIEBER, N. S.; IVERSSON, L. B. Serological survey on arbovirus infection in residents of an ecological reserve. **Rev Saude Publica**, v. 34, n. 3, p. 236-42, Jun 2000.

ROMEIRO, M. R; et al. Serological evidence of Mayaro virus infection in blood donors from São Carlos, São Paulo, Brazil. **Trans R Soc Trop Med Hyg** 1–4, 2020

ROSS, R. W., The Newala epidemic. III. The virus: isolation, pathogenic properties and relationship to the epidemic. **J Hyg (lond)**, v. 54(2): p. 177-9, 1956.

RYMAN, K. D. W.B KLIMSTRA, Host response to alphavirus infection. **Immunol REV**, v 225: p 27-45, 2008.

SABINO- Jr. et al. Natural infection of Neotropical bats with hantavirus in Brazil. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–8, 2018.

SCHWARTZ, O; M.L. ALBERT, Biology and pathogenesis of chikungunya virus. **Nat Rev Microbiol**, v. 8(7): p. 491-500, 2010.

SIMON, A. Y; SUTHERLAND, M. R; PRYZDIAL, E. L.G. Y. Simon, Michael R. Sutherland, and Edward L. G. Pryzdial Dengue virus binding and replication by platelets. **Rev. Blood**, v. 126(3):378-385. 2015

SIMON, I.D.; VAN ROOIJEN, N.; ROSE, J.K. Vesicular stomatitis virus genomic RNA persists in vivo in the absence of viral replication. **J. Virol**. v. 84, 3280–3286, 2010.

SLAVOV et al. Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil. **Hematology, Transfusion and Cell Therapy**. V. 40, p. 358-362 October–December 2018

SLAVOV, S. N., K. K. OTAGUIRI, et al. Seroprevalence of Chikungunya virus in blood donors from Northern and Southeastern Brazil. **Hematol Transfus Cell Ther**, v. 40(4), p. 358-362, Oct 2017

SMATTI M. K et al. Epstein–Barr Virus Epidemiology, Serology, and Genetic Variability of LMP-1 Oncogene Among Healthy Population: An Update. **Rev. Frontiers in Oncology**. V.8, 2018.

SOLIGNAT, M., et al. Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Virology**, v. 25; 393(2), p,183–197. 2009.

SOLIGNAT, M; et al Replication cycle of chikungunya: A re-emerging arbovirus. **Rev. Virology**. v. 393. 183–197. 2009.

SOUZA et al. Emergence of the East-CentralSouth-African genotype of Chikungunya virus in Brazil and the city of Rio de Janeiro may have occurred years before surveillance detection. **Scientific Reports Nature**. P. 1-7, 2019

STRAMER S. L., et al. US blood donor screening for Trypanosoma cruzi: clinical studies and early assessment of prevalence [abstract]. **Transfusion**, 47, 2007.

STRAMER, S. L, et al. Emerging infectious disease agents and their potential threat to transfusionsafety. **Transfusion**. 49:1S–29S. 2009.

STRAUSS, E. G., C. M, RICE, J. H. STRAUSS. Complete nucleotide sequence of the genomic RNA of Sindbis virus. **Virology**, v. 133 (1): p 92-110, 1984.

STRAUSS, J. H.; STRAUSS, E. G. The alphaviruses: gene expression, replication, and evolution. **Microbiol Rev**, v. 58, n. 3, p. 491-562, Sep 1994.

SUHRBIER, A., M. et al. Arthriogenic alphaviruses-- an overreview. **Nat Rev Rheumatol**, 2012. 8(7): p. 420-9

SURTHERLAND S. et al. Dengue virus persists and replicates during storage of platelet and red blood cell units Rev. **Blood Components V**. 56, May 2016

SYDERA, J; S, MUKHOPADHYAY. The Alphavirus E3 Glycoprotein Functions in a Clade-Specific Manner. **J. of Virol**. v. 86, p. 13609–13620. Number 24. December 2012.

TAUIL, P. L. Transmissibility conditions of chikungunya fever. Epidemiol. **Serv. Saúde**, v.23, n. 4, Brasília Oct./Dec. 2014

TAXONOMY, **International Committee on Taxonomy of Viruses – ICTV**. Disponível em: <https://talk.ictvonline.org/taxonomy/> Acesso em 5 de mar 2019

TOBLER, H. L; BUSCH, M. P. History of posttransfusion hepatitis. **Clinical Chemistry**, v 43:8(B), 1997

TOGAVIRIDAE, 2011, **International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV**. disponível em: https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses2011/w/posrna_viruses/275/togaviridae . Acesso em 14/03/2020.

UBIALI, E. M. A. O processo hemoterápico e as etapas do ciclo do sangue. In: BRASIL. Ministério da Saúde. **Manual de orientações para promoção da doação voluntária de sangue**. Brasília: Ministério da Saúde, 2015.

VASCONCELOS H.B.; et al. Molecular epidemiology of Oropouche virus, Brazil. **Emerging Infection Diseases**. v. 17(5):800-806, 2011.

VASCONCELOS, P. F. et al. Epidemiology of encephalitis caused by arbovirus in the Brazilian Amazonia. **Rev Inst Med Trop Sao Paulo**, v. 33, n. 6, p. 465-76, Nov-Dec 1991.

VASCONCELOS, P. F. C.; et al. Clinical and ecoepidemiological situation of human arboviruses in Brazilian Amazonia. **Journal of the Brazilian Association for the Advancement of Science (Ciência e Cultura)**, v. 44, p. 117-124, 1992.

WAGGONER, J.J.; et al. Real-time RT-PCR for Mayaro virus detection in plasma and urine. **Journal of Clinical Virology** , v. 98, p. 1-4, 2018.

WANDALL, H. H., et al. The origin and function of platelet glycosyltransferases **Blood**. v. 120(3): 626–635. 2012

WEAVER S. C, REISEN W. K. Present and future arboviral threats. **Antiviral Res.** v. 85(2):328-45, 2010.

WEAVER, S, LECUIT M., Chikungunya Virus and the Global Spread of a Mosquito-Borne Disease. **The new england journal of medicine** 372; 13. 2015

WOODALL, J. P. Virus Research in Amazonia. **In: Atlas do Simpósio sobre a Biota Amazônica (Patologia) (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico – CNPQ)**, V. 6, pp 31. Rio de Janeiro: CNPQ. 1987.

ZIMRING, J. C; NESTER, T. Leukoreduction of Blood Products. **Rev. Transfusion Medicine and Hemostasis** (second Edition), 2013.

ANEXOS

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: ESTUDO SOBRE A VIABILIDADE DE ARBOVÍRUS EMERGENTES EM PRODUTOS DO SANGUE

Pesquisador: Ana Beatriz dos Anjos Souza

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 08787219.7.0000.5440

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.252.505

Apresentação do Projeto:

Os arbovírus provocam graves problemas de saúde pública em países tropicais e subtropicais. Estas arboviroses geralmente sub-diagnosticadas, envolvem manifestações clínicas que vão de infecção assintomática, doença febril aguda a febre hemorrágica viral e encefalites. Devido ao alto número de infecções assintomáticas e a alta viremia produzida arbovírus, doadores de sangue poderiam veicular estes vírus via transfusional. Considerando as epidemias causadas pelos vírus Dengue, Febre Amarela, Zika, Chikungunya, Mayaro e Oropouche no Brasil, somado a fatores ambientais como o clima e principalmente, a alta infestação urbana por mosquitos do gênero Aedes, podem ser responsáveis por uma grande disseminação destes vírus pelo país. Assim, estes arbovírus que causam graves epidemias podem representar um sério risco para a segurança dos produtos do sangue. O presente estudo objetiva avaliar a viabilidade de arbovírus emergentes em produtos do sangue, e avaliar o risco de transmissão destes vírus via transfusional. Em suma, este estudo será importante no serviço de hemoterapia e também colaborará para melhorar a qualidade dos produtos de sangue oferecidos no Brasil.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Avaliar a viabilidade de arbovírus em produtos do sangue, através de infecções artificiais destes produtos.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3602-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 3.352.505

Objetivo Secundário:

Avaliar a viabilidade dos Flavivirus Dengue, Febre Amarela, Zika em produtos do sangue tais como concentrado de hemácias, plaquetas e plasma; Avaliar a viabilidade do Alphavirus Mayaro e Chikungunya em produtos do sangue tais como concentrado de hemácias, plaquetas e plasma; Avaliar a viabilidade do Orthobunyavirus Oropouche em produtos do sangue tais como concentrado de hemácias, plaquetas e plasma; Realizar tentativas de isolamento dos vírus detectados nos produtos de sangue.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Não se aplica

Benefícios:

Este estudo trará para sociedade os seguintes benefícios: avaliação de possíveis riscos de transmissão de arbovírus via transfusional. Constam no projeto e TCLE como sugerido anteriormente.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Metodologia Proposta:

4.1. Preparação dos Estoques virais Sementes dos vírus Dengue, Febre Amarela, Zika, Mayaro, Chikungunya e Oropouche, em estoque no Centro de Pesquisa em Virologia, serão utilizadas para infectar células C6/36, uma linhagem contínua oriunda do mosquito *Aedes albopictus* (IGARASHI, 1978). As células serão mantidas a 26° C, em frascos de 75 cm² (Corning Incorporated, EUA), em meio Leibovitz-15 (L-15) (Vitrocell, Campinas) suplementado com 10% de Soro Fetal Bovino (SBF) (Vitrocell, Campinas), 1% de L-Glutamina 200Mm (Vitrocell, Campinas), 1% de antibióticos (penicilina 100U/mL, estreptomicina 1mg/mL) (Vitrocell, Campinas) e 10% do fosfato de triptose (Vitrocell, Campinas). Frascos contendo monocamadas confluentes de células C6/36 serão infectados com 100µl de cada um dos vírus citados neste estudo. Os frascos serão mantidos em estufa por 1 hora para adsorção dos vírus e em seguida, será adicionado o meio L-15 contendo 2% de SBF, armazenando-os, posteriormente, a 28°C. Após período de infecção de 5 a 7 dias, o sobrenadante será retirado, juntamente com a monocamada de células, e centrifugado a 1000 rpm e a 4°C, por 20 minutos. Após centrifugar, o sobrenadante removido, será aliquoteado (500 µL por tubo) e armazenado a -70°C como estoque viral, após comprovação da infecção por teste de imunofluorescência indireta (IFA) e RT-PCR. Também uma alíquota será utilizada para a titulação pela técnica de ensaio de placa. 4.2. Imunofluorescência Indireta Para identificar antígenos virais nas células C6/36 nos estoques virais que serão

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3802-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer: 3.262.503

produzidos, será realizada a técnica de imunofluorescência indireta. Para tanto, as células serão lavadas com solução fisiológica e centrifugadas. Em seguida, 10µl do precipitado celular será colocado nos spots da lâmina de lâmina, que será seca a temperatura ambiente e fixada por banho em acetona gelada, durante 10 minutos. Na sequência, será adicionado 20µl, na diluição 1:20, do fluido ascítico de camundongos hiper-imunizados (estocados no laboratório) contra os vírus infectantes e após incubar a 37°C, por 30 minutos, será adicionado nos spots 20µl de um conjugado de anticorpo anti-IgG de camundongo à fluoresceína (FITC), na diluição 1:80 (Sigma-Aldrich, St. Louis EUA), seguindo por mais 30 minutos de incubação a 37°C. As lâminas serão visualizadas em microscópio, sob luz ultravioleta, buscando por fluorescência citoplasmática indicativa da presença viral na célula. 4.3. Técnica de RT-PCR 4.3.1. Extração do RNA RNA viral será extraído utilizando o kit QIAamp Viral RNA Mini Kit (Qiagen, Hilden, Alemanha), de acordo com o protocolo do fabricante. O RNA será eluído em 50µl de tampão de eluição livre de RNase e armazenado a -70°C. 4.3.2. Síntese do DNA complementar Os RNAs extraídos de todos os vírus serão submetidos a reação de transcriptase reversa utilizando primer randômico e também a enzima SuperScript III (Invitrogen, Carlsbad, EUA), segundo as instruções do fabricante. 4.3.3. RT-PCR em tempo real para Alphavirus 4.3.4. RT-PCR em tempo real para Flavivirus 4.3.5. RT-PCR em tempo real para Oropouche 4.4. Titulação dos estoques virais 4.5. Amostras 4.6. Infecção das Bolsas de Sangue 4.3. Isolamento viral 5. ANALISE DOS RESULTADOS

As adequações sugeridas foram incorporadas no projeto e TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos foram anexados.

Recomendações:

Não se aplica.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Diante do exposto e à luz da Resolução CNS 466/2012, o projeto de pesquisa Versão 2 13/03/2019, assim como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido Versão 2 13/03/2019, podem ser enquadrados na categoria APROVADO.

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto Aprovado: Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP, relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP em nova versão, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO
Bairro: MONTE ALEGRE CEP: 14.048-900
UF: SP Município: RIBEIRÃO PRETO
Telefone: (16)3652-2228 Fax: (16)3633-1144 E-mail: cep@hcrp.usp.br

USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DE RIBEIRÃO

Continuação do Parecer 3.252/2019

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	FB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P ROJETO_1172220.pdf	28/03/2019 21:54:16		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Beatrizo.pdf	26/03/2019 21:53:36	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_PROJETO_REGULAR_.pdf	15/03/2019 21:02:33	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	RECONS_PLATAFORMA.pdf	15/03/2019 21:01:44	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
Cronograma	CRONOGRAMA_1.pdf	11/03/2019 22:07:40	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
Orçamento	ORCAMENTO_UPC.pdf	08/02/2019 12:35:15	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
Folha de Rosto	FOLHADEROSTO_BIA.pdf	07/01/2019 09:24:56	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
Outros	CARTAANUENCIA_BIA.pdf	07/01/2019 09:22:18	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito
Orçamento	Orçamento_detalhado.pdf	07/01/2019 09:21:43	Ana Beatriz dos Anjos Souza	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

RIBEIRÃO PRETO, 09 de Abril de 2019

Assinado por:
MARCIA GUIMARÃES VILLANOVA
(Coordenador(a))

Endereço: CAMPUS UNIVERSITÁRIO

Bairro: MONTE ALEGRE

CEP: 14.048-900

UF: SP

Município: RIBEIRÃO PRETO

Telefone: (16)3602-2229

Fax: (16)3633-1144

E-mail: cep@hcrp.usp.br

Página 04 de 04

CARTA DE ANUÊNCIA

A direção do(a) setor/departamento de Ensino, da Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Carlos, autoriza a realização do projeto de pesquisa "Estudo sobre a viabilidade de arbovírus emergentes em produtos do sangue", que será realizado sob responsabilidade da aluna de mestrado Ana Beatriz dos Anjos Souza sob orientação do Prof. Luiz Tadeu Moraes, do Departamento de Clínica Médica da Universidade São Paulo da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. Estamos cientes que o projeto e os pesquisadores atendem plenamente o determinado pela resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde que regulamenta as diretrizes e normas sobre pesquisas envolvendo seres humanos.

São Carlos, 29 de Junho de 2018

Ariane Amábile Lima Iarzoli

Coordenadora do Serviço de Hemoterapia
Santa Casa São Carlos

Dr. Adriano Marinovic
Vice-Diretor Técnico