

FERNANDO RABIOGLIO GIUGNI

**Patogenia de envolvimento do coração na febre amarela: aspectos clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular em casos de autópsia realizados pelo Departamento de Patologia, durante a epidemia de 2017-2019**

Tese apresentada à Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Ciências

Programa de Patologia

Orientador: Dr. Amaro Nunes Duarte Neto

Versão corrigida. Resolução CoPGr 6018, de 13 de outubro de 2011.

A versão original está disponível na biblioteca da FMUSP.

São Paulo

2023

**Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)**

Preparada pela Biblioteca da  
Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo

©reprodução autorizada pelo autor

Giugni, Fernando Rabioglio

Patogenia de envolvimento do coração na febre amarela : aspectos clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular em casos de autópsia realizados pelo Departamento de Patologia, durante a epidemia de 2017-2019 / Fernando Rabioglio Giugni. -- São Paulo, 2023.

Tese (doutorado) -- Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Programa de Patologia.

Orientador: Amaro Nunes Duarte Neto.

Descritores: 1.Febre amarela 2.Miocárdio  
3.Miocardite 4.Sistema de condução cardíaco  
5.Endotélio vascular 6.Citocinas 7.Quimioquinas  
8.Autópsia 9.Epidemia

USP/FM/DBD-161/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

## **NORMATIZAÇÃO ADOTADA**

Esta tese está de acordo com as seguintes normas, em vigor no momento desta publicação:

Referências: adaptado de International Committee of Medical Journals Editors (Vancouver).

Universidade de São Paulo. Faculdade de Medicina. Divisão de Biblioteca e Documentação. Guia de apresentação de dissertações, teses e monografias. Elaborado por Anneliese Carneiro da Cunha, Maria Julia de A. L. Freddi, Maria F. Crestana, Marinalva de Souza Aragão, Suely Campos Cardoso, Valéria Vilhena. 3a ed. São Paulo: Divisão de Biblioteca e Documentação; 2011.

Abreviaturas dos títulos dos periódicos de acordo com List of Journals Indexed in Index Medicus.

A Deus, Princípio e Fim

A Melina, minha esposa, fonte de infinito amor, que dá sentido a esta tese

A Claudia, Carlos e Carolina, minha família, que me apoia de forma incondicional

## AGRADECIMENTOS

Ao Dr. Amaro Nunes Duarte Neto, meu orientador e amigo, que apostou em mim. Agradeço pelos ensinamentos, suporte, carinho e dedicação. Por todo o tempo investido nesta tese. Por me estimular, desde que nos conhecemos, a perseverar na pesquisa. A FMUSP pode se orgulhar por lhe escolher para o corpo docente.

À equipe do LEMB-USP, em especial ao Shahab Pour e ao Marielton Cunha, pela ajuda em diversos pontos deste trabalho, na coleta e armazenamento dos tecidos, na realização do RT-PCR, na separação de tecidos para extração de proteínas e RNA. Agradeço ao Shahab pela disponibilidade e prontidão em colaborar, e pelo zelo com que faz seu trabalho.

À Profa. Leila Antonangelo e, em especial, à Caroline Silvério, sempre disposta a ajudar, pela contribuição na realização e interpretação dos experimentos do Luminex. Agradeço à Michele Gouvêa pelo suporte no armazenamento de tecidos e extração de proteínas.

À Profa. Vera Aiello, pela ajuda com a avaliação do sistema de condução elétrico do coração. As discussões e ensinamentos foram de extrema importância para mim.

Ao Felipe Ledesma, talentoso patologista e companheiro dos campos de rugby, pela ajuda em diversos momentos da tese, em especial na contagem da imunohistoquímica. À Caroline Morais, pela ajuda decisiva nas últimas contagens.

Ao Henrique Pinesi, companheiro nas aventuras da Cardiologia, pela ajuda na coleta de dados clínicos. Ao Igor Marinho e à Juliana Morás, grandes amigos, pela ajuda decisiva na reta final.

À Profa. Elia Caldini e à equipe da microscopia eletrônica, pela contribuição no uso desta ferramenta. À Sandra Fernezlian e à equipe do Laboratório de Imunohistoquímica, pela paciência e ajuda com as reações. Às equipes do SVO, da histotécnica e do Depto. de Patologia em geral, docentes, médicos assistentes, residentes e colaboradores.

À Profa. Marisa Dolhnikoff, pelos ensinamentos sobre raciocínio e redação científica, fundamentais na minha formação como pesquisador. Aos Profs Thais Mauad, Paulo Saldiva e Luis Fernando Ferraz da Silva, pelo suporte ao meu projeto e discussões sobre a patologia da COVID-19, muito úteis para esta tese.

Aos Profs. Venancio Avancini Ferreira Alves, Gil Bernard e Dewton Vasconcelos, pela inestimável contribuição no Exame de Qualificação, enriquecendo este trabalho.

Ao Prof. José Eduardo Krieger, pela confiança e oportunidade de participar do Centro de Medicina de Precisão em Cardiologia. Sua trajetória de dedicação à ciência é inspiradora. Tenho grande expectativa para continuar aprendendo e trabalhando ao seu lado.

Ao Prof. Carlos Serrano, pelo exemplo como médico e inúmeras oportunidades ao longo desta trajetória.

Aos colegas e amigos da equipe de Clínica Médica, Maurício Gattaz, Francisco Torggler, Daniel Carvalho e Guilherme Pereira, pela parceria e exemplo no exercício da medicina.

A todos colegas e amigos do CARDIOGEN, Luciana Sacilotto, Natália Olivetti, Fernanda Andrade, Marjorie Mizuta, Silas Furquim, Lorena Capeline, Layara Lipari, Lucas Pires, Bianca Linnenkamp, Bruno Stephan, Leonardo Carvalho, Emanuelle Marques, Renata Carmona, Karina, Michelle, Fernanda e tantos outros pelo companheirismo quase diário. Agradeço em especial à Mariana Carvalho e ao Felipe Elias pela ajuda na extração e avaliação da integridade do RNA.

Aos professores e colegas de trajetória da FMUSP, HC e InCor, em todas as etapas, cada qual à sua maneira, por terem me auxiliado a chegar até aqui. Aos pacientes, que confiaram suas vidas e a de seus entes queridos aos nossos cuidados, com quem tanto aprendi e por quem tenho muita gratidão.

Aos meus pais, Claudia e Carlos, que proporcionaram todas as oportunidades para que eu pudesse chegar até aqui. Vocês são parte indispensável desta tese. À minha irmã, Carol, que sempre me incentivou a ir adiante.

À Melina, que, além da imprescindível ajuda na coleta de dados, avaliação de eletrocardiogramas, discussão de ideias, revisão e diagramação do texto, me encorajou a embarcar neste desafio: um projeto que absolutamente fugia à minha comodidade. Obrigado pelo apoio constante, diário, mesmo quando o desânimo parecia tomar conta. Esta tese não teria sido possível sem você.

## EPÍGRAFE

“O correr da vida embrulha tudo,  
a vida é assim: esquenta e esfria,  
aperta e daí afrouxa, sossega e depois desinquieta.  
O que ela quer da gente é coragem.”

Trecho de “Grande Sertão, Veredas”, João Guimarães Rosa



## RESUMO

Giugni FR. Patogenia de envolvimento do coração na febre amarela: aspectos clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular em casos de autópsia realizados pelo Departamento de Patologia, durante a epidemia de 2017-2019 [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2023.

**Introdução:** a febre amarela é uma febre hemorrágica viral, endêmica em regiões da América do Sul e da África. A sua patogenia é pouco compreendida, com a maioria dos estudos voltados especificamente para as alterações do fígado, havendo evidências escassas sobre as lesões extra-hepáticas, incluindo a cardíaca. O objetivo deste estudo é avaliar e descrever a patologia do coração, associada a características clínicas, em casos fatais de febre amarela, autopsiados pelo Departamento de Patologia da FMUSP, durante a epidemia de 2017-2019. **Métodos:** trata-se de estudo retrospectivo de autópsia, incluindo pacientes com diagnóstico confirmado de febre amarela entre 2017 e 2019, na Região Metropolitana de São Paulo. Foram realizadas revisão de dados de prontuários, avaliação macroscópica e histopatológica cardíaca, microscopia eletrônica, ensaios de imunohistoquímica para imunofenotipagem de células inflamatórias e pesquisa de antígeno do vírus da febre amarela *in situ*, RT-qPCR para pesquisa de RNA viral no miocárdio, e análise proteômica de citocinas inflamatórias e proteínas relacionadas à lesão endotelial por imunensaio multiplex. Amostras de tecido miocárdico de pacientes falecidos por doenças cardiovasculares e por sepse foram incluídas para análise comparativa dos resultados de imunohistoquímica e proteômica. **Resultados:** foram incluídos 73 pacientes com uma mediana de idade de 48 (34-60) anos. Foram observados choque (100%), uso de inotrópicos (5,5%), taquiarritmias supraventriculares (20,5%) e bradiarritmias (6,8%). Foram realizados eletrocardiograma em 42 (57,5%) pacientes, com 34 (81,0%) alterados, e dosagem de troponina T em 58 (79,5%), com 54 (93,1%) casos com níveis elevados. À macroscopia, 78,9% dos corações examinados apresentaram peso acima de 350g e 60,0% apresentaram aumento da espessura do ventrículo esquerdo. À microscopia, foram observadas: miocardioesclerose em 68 (93,2%) pacientes, hipertrofia de cardiomiócitos em 68 (93,2%), alterações endoteliais em 67 (91,8%), necrose de fibras em 50 (68,5%), e miocardite em 14 (19,2%) casos, sendo 9 (12,3%) de etiologia viral. A avaliação do sistema de condução elétrico mostrou alta prevalência de edema e hemorragia. O infiltrado inflamatório miocárdico teve predomínio de macrófagos (células CD68 positivas). Em todos os casos avaliados foi observada a presença de antígeno viral, localizado no citoplasma de células inflamatórias e de células endoteliais do miocárdio. A análise de RT-qPCR resultou positiva em 66 (95,7%) dos 69 casos avaliados. A avaliação proteômica mostrou maior concentração de MCP-1, MIP-1 $\beta$ , GM-CSF, IP-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF $\gamma$ , IL-10 e IL-4 no miocárdio de casos de febre amarela em comparação a controles com morte cardiovascular, e uma maior concentração de IP-10 em relação a controles

cardiovasculares e de sepse. Na avaliação proteômica da função endotelial, foi identificada maior concentração de angiopoietina-2, endotelina-1, syndecan-1, VCAM-1 e PAI-1 no miocárdio de casos fatais de febre amarela em relação ao miocárdio de casos por óbito cardiovascular, mas sem diferença em relação a casos de sepse. **Conclusão:** a febre amarela causa frequente lesão cardíaca, clínica e histopatológica, em casos graves. Tal injúria decorre de mecanismos multifatoriais, incluindo a ação direta do vírus da febre amarela no tecido cardíaco, o processo inflamatório *in situ* e sistêmico, e a lesão de células endoteliais.

**Palavras-chave:** Febre amarela. Miocárdio. Miocardite. Sistema de condução cardíaco. Endotélio vascular. Citocinas. Quimiocinas. Autópsia. Epidemia.

## ABSTRACT

Giugni FR. Pathogenesis of heart involvement in yellow fever: clinical, histopathological, immunohistochemical and molecular biology aspects in autopsy cases performed in the Pathology Department during the 2017-2019 epidemic [thesis]. São Paulo: “Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo”; 2023.

**Introduction:** yellow fever is a viral hemorrhagic fever, endemic in parts of South America and Africa. Its pathogenesis is not well understood, with most studies focusing on liver abnormalities, and there is scarce evidence on extrahepatic lesions, including cardiac injury. The objective of this study is to evaluate and describe the pathology of the heart, associated with clinical characteristics, in fatal cases of yellow fever, autopsied by the Pathology Department of FMUSP, during the 2017-2019 epidemic. **Methods:** this is a retrospective autopsy study, including patients with a confirmed diagnosis of yellow fever between 2017 and 2019, in the Metropolitan Region of São Paulo. We reviewed data from medical records, performed macroscopic and histopathological evaluation of the heart, electron microscopy, immunohistochemical assays for immunophenotyping of inflammatory cells and in situ assessment of yellow fever virus antigen, RT-qPCR for evaluation of viral RNA in the myocardium, and proteomics analysis of inflammatory cytokines and proteins related to endothelial injury by multiplex immunoassay. Myocardial tissue samples from patients who died due to cardiovascular diseases and sepsis were included for comparative analysis in immunohistochemistry and proteomics assays. **Results:** A total of 73 patients with a median age of 48 (34-60) years were included. We observed shock (100%), use of inotropes (5.5%), supraventricular tachyarrhythmias (20.5%) and bradyarrhythmias (6.8%). An electrocardiogram was performed in 42 (57.5%) patients, and 34 (81.0%) had alterations; troponin T was measured in 58 (79.5%), and 54 (93.1%) had elevated levels. At macroscopic assessment, 78.9% of the examined hearts weighed more than 350g and 60.0% showed increased left ventricular wall thickness. In microscopic analysis, we observed the following abnormalities: interstitial fibrosis in 68 (93.2%) patients, cardiomyocyte hypertrophy in 68 (93.2%), endothelial alterations in 67 (91.8%), fiber necrosis in 50 (68.5%), and myocarditis in 14 (19.2%) cases, 9 (12.3%) of which had a viral etiology. The evaluation of the electrical conduction system showed a high prevalence of edema and hemorrhage. The myocardial inflammatory infiltrate had a majority of macrophages (CD68 positive cells). In all evaluated cases, viral antigen was found, located in the cytoplasm of inflammatory cells and endothelial cells of the myocardium. RT-qPCR analysis was positive in 66 (95.7%) of the 69 cases evaluated. The proteomic evaluation showed a higher concentration of MCP-1, MIP-1 $\beta$ , GM-CSF, IP-10, IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , INF $\gamma$ , IL-10 and IL-4 in the myocardium of yellow fever cases compared to controls with cardiovascular death, and a higher IP-10 concentration compared to cardiovascular and sepsis controls. In the proteomic evaluation of endothelial function, we found a higher concentration of angiopoietin-2,

endothelin-1, syndecan-1, VCAM-1 and PAI-1 in the myocardium of fatal cases of yellow fever compared to the myocardium of cases of cardiovascular death, but no difference compared to cases of sepsis. **Conclusion:** yellow fever frequently causes clinical and histopathological cardiac lesions in severe cases. Such injury results from multifactorial mechanisms, including the direct action of the yellow fever virus on cardiac tissue, *in situ* and systemic inflammatory response, and endothelial cells damage.

**Keywords:** Yellow fever. Myocardium. Myocarditis. Heart conduction system. Vascular endothelium. Cytokines. Chemokines. Autopsy. Epidemic.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Ang-2	Angiopietina-2
AV	Atrioventricular
BNP	Peptídeo natriurético tipo B
CCL2	<i>C-C motif chemokine ligand 2</i>
CCL4	<i>C-C motif chemokine ligand 4</i>
CD	Cluster de diferenciação
CD40L	Ligante de Cluster de diferenciação 40
CEP	Comissão de Ética em Pesquisa
CIVD	Coagulação intravascular disseminada
COVID-19	<i>Coronavirus disease 2019</i>
COX-2	Ciclo-oxigenase-2
CXCL10	<i>C-X-C motif chemokine ligand 10</i>
DAB	Diaminobenzidina
DPOC	Doença Pulmonar Obstrutiva Crônica
DRC	Doença Renal Crônica
DVA-VFA	Doença viscerotrópica aguda associada à vacina febre amarela
ECG	Eletrocardiograma
ELISA	Ensaio de imunoabsorção enzimática
FA	Febre Amarela
FE	Fração de ejeção
FMUSP	Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
GM-CSF	Fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos
HAS	Hipertensão Arterial Sistêmica
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP
HSP70	Proteína de choque térmico de 70 kD
ICAM-1	<i>Intercellular adhesion molecule 1</i>
ICB	Instituto de Ciências Biomédicas
ICHC	Instituto Central do Hospital das Clínicas
Ig	Imunoglobulina
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina

IL-1RA	Antagonista de receptor de interleucina 1
INF- $\gamma$	Interferon gama
iNOS	<i>Inducible nitric oxide synthase</i>
IP-10	Proteína 10 induzida por interferon gama
LED	<i>Light emitting diode</i>
LEMB	Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática
LIM	Laboratório de investigação médica
LSN	Limite superior da normalidade
MCP-1	<i>Monocyte chemoattractant protein 1</i>
MFI	<i>Media fluorescence intensity</i>
MIP-1 $\beta$	<i>macrophage inflammatory protein 1 - beta</i>
NAV	Nó atrioventricular
NHP	Primatas não humanos
NK	<i>Natural Killer</i>
NS	Não significativo
NS1	Não estrutural 1
NSA	Nó sinoatrial
NT-proBNP	Porção N-terminal do pró-hormônio natriurético tipo B
PAI-1	Inibidor de ativação de plasminogênio
PAS	Ácido Periódico de Schiff
PBS	Tampão fosfato-salino
RNA	Ácido ribonucleico
RT-PCR	Reação em cadeia de polimerase via transcriptase reversa
RT-qPCR	Transcrição reversa quantitativa reação em cadeia de polimerase *
sST2	<i>Soluble suppression of tumorigenesis-2</i>
SVOC-USP	Serviço de Verificação de Óbito da Capital da USP
TBS	Tampão tris-fosfato
Th	T helper
TNF- $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TSV	Taquicardia supraventricular
USP	Universidade de São Paulo
UTI	Unidade de terapia intensiva
VCAM-1	<i>Vascular cell adhesion molecule 1</i>
VD	Ventrículo direito

VE	Ventrículo esquerdo
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular
VR	Valor de referência
vWF-A2	Fator de von Willebrand A2

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Marcadores de interesse para a imunopatologia do coração da sepse...	29
Tabela 2 - Marcadores de interesse para a fisiopatologia da lesão endotelial do coração na sepse e arboviroses.....	34
Tabela 3 - Características e concentração dos anticorpos utilizados para as reações de imunohistoquímica.....	44
Tabela 4 - Características demográficas e clínicas de casos fatais de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	54
Tabela 5 - Exames complementares de casos fatais de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	56
Tabela 6 - Achados macroscópicos cardíacos em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	58
Tabela 7 - Alterações histopatológicas cardíacas em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	60
Tabela 8 - Contagem de células marcadas por reação imunohistoquímica em tecido miocárdico de autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	63
Tabela 9 - Alterações do sistema de condução cardíaco em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	66
Tabela 10 - Características dos casos de doença viscerotrópica aguda associada à vacina da febre amarela submetidos a autópsia durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	74



## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Mapa das regiões onde a vacinação para febre amarela é recomendada para viajantes na América do Sul.....	23
Figura 2 - Ciclos de transmissão da febre amarela.....	24
Figura 3 - Esquema ilustrativo do complexo sanduíche no imunoensaio multiplex..	47
Figura 4 - Esquema ilustrativo das etapas do imunoensaio multiplex.....	49
Figura 5 - Exemplo de curva de detecção do imunoensaio multiplex.....	50
Figura 6- Fluxograma de inclusão de pacientes.....	52
Figura 7 - Alterações histopatológicas cardíacas em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	61
Figura 8 -Aspectos histológicos e de imunohistoquímica no tecido cardíaco examinado em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	64
Figura 9 - Análise comparativa da contagem de células marcadas por imunohistoquímica conforme diagnóstico, em tecido cardíaco de autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	65
Figura 10 - Aspectos patológicos do sistema de condução cardíaco em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	67
Figura 11 - Aspectos ultraestruturais cardíacos em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil.....	68
Figura 12 - Comparação entre a concentração de citocinas inflamatórias em tecido cardíaco de pacientes com febre amarela e de controles com sepse e morte cardiovascular.....	70

Figura 13 - Comparação entre a concentração de proteínas relacionadas à função endotelial em tecido cardíaco de pacientes com febre amarela e de controles com sepse e morte cardiovascular..... 71

Figura 14 - Comparação entre a concentração de proteínas relacionadas a trombose e hemostasia em tecido cardíaco de pacientes com febre amarela e de controles com sepse e morte cardiovascular..... 72

# SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS

RESUMO

ABSTRACT

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE FIGURAS

<b>1- INTRODUÇÃO .....</b>	<b>20</b>
1.1- Febre amarela.....	21
1.2- Patologia de autópsia na febre amarela .....	24
1.3- O coração na febre amarela .....	26
1.4- O coração na sepse e nas arboviroses.....	27
<b>2- OBJETIVOS.....</b>	<b>35</b>
<b>3- MÉTODOS.....</b>	<b>37</b>
3.1- Desenho do estudo e critérios de inclusão .....	38
3.2- Dados demográficos e clínicos .....	38
3.3- Análise de macroscopia e histopatologia do coração .....	39
3.4- Análise de imunohistoquímica .....	41
3.5- Microscopia eletrônica .....	42
3.6- Detecção e quantificação de RNA viral.....	43
3.7- Análise proteômica via imunoensaio multiplex .....	43
3.7.1- Extração das proteínas do tecido cardíaco .....	44
3.7.2- Quantificação proteica por imunoensaio multiplex .....	44
3.8- Análise estatística .....	48
<b>4- RESULTADOS .....</b>	<b>49</b>
4.1- Características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos.....	49
4.2- Achados gerais de autópsia e de macroscopia cardíaca em casos fatais de FA .....	55
4.3- Achados histopatológicos .....	56
4.4- Imunohistoquímica.....	59
4.5- Sistema de condução cardíaco.....	63
4.6- Microscopia eletrônica .....	66
4.7- Detecção de RNA viral.....	67
4.8- Avaliação proteômica.....	67
4.9- Subanálise do grupo com DVA-VFA.....	71
<b>5- DISCUSSÃO .....</b>	<b>73</b>
5.1- Aspectos gerais da lesão miocárdica associada à febre amarela.....	74
5.2- A FA é uma doença sistêmica grave e os pacientes apresentam lesão miocárdica e endotelial frequente .....	74

5.3- A inflamação local e sistêmica é importante mecanismo de lesão miocárdica, com alta concentração de citocinas, como IP-10, e miocardite aguda viral .....	76
5.4- Na FA grave, observa-se uma lesão endotelial difusa no coração, semelhante ao que ocorre na sepse grave. Em alguns casos, há evidências de infecção da célula endotelial pelo vírus da FA. ....	78
5.5- Há substrato histológico no sistema de condução que justifique bradicardia e sinal de Faget .....	79
5.6- Casos vacinais têm características semelhantes aos silváticos, porém com alta prevalência de miocardite .....	80
5.7- Limitações do estudo .....	81
5.8- Impacto e perspectivas em uma doença tropical negligenciada .....	82
<b>6- CONCLUSÕES.....</b>	<b>84</b>
6.1- Conclusões sumarizadas.....	85
6.2- Conclusão final .....	85
<b>7- REFERÊNCIAS .....</b>	<b>86</b>
<b>8- APÊNDICES .....</b>	<b>96</b>
<b>9- ANEXOS .....</b>	<b>106</b>



### 1.1- Febre amarela

A febre amarela (FA) é uma doença viral hemorrágica sistêmica de alta morbimortalidade. É causada por um vírus RNA de fita única, considerado o protótipo da família *Flaviviridae*, transmitido por artrópodes.<sup>1</sup> A FA tem grande relevância histórica. Acredita-se que tenha sido trazida para a América no século XVII com o tráfico de africanos escravizados. Desde então, espalhou-se pelo continente americano, causando graves surtos e epidemias durante os séculos seguintes. Durante a Guerra Hispano-Americana, em Cuba, estima-se que para cada soldado morto em combate, doze soldados tenham falecido vítimas da FA. No final do século XIX e início do século XX, descobertas científicas trouxeram importantes avanços no combate à FA, destacando-se: a teoria da transmissão pelo *Aedes aegypti*, do cubano Carlos Finlay, provada em 1901 pelo americano Walter Reed; o isolamento do agente etiológico, o vírus da FA, por Adrian Stokes, na Inglaterra, em 1927; e o desenvolvimento da vacina pelo sul-africano Max Theiler, na década de 1930, que o levaria a ser laureado com o Prêmio Nobel de Fisiologia e Medicina em 1951. Através da vacina e do controle do vetor, foi possível erradicar a FA na América do Norte e na Europa, restringindo a doença a regiões economicamente menos favorecidas.<sup>2,3</sup> A redução no interesse e, conseqüentemente, no investimento em pesquisa científica por grande parte da comunidade internacional levou a FA a ser considerada como uma das doenças tropicais negligenciadas no final do século XX.<sup>4</sup>

A FA é endêmica em grande parte da África (27 países) e Américas Central e do Sul (13 países). Estima-se que seja responsável por cerca de 200.000 casos por ano, com letalidade que varia de 20% na África Ocidental a cerca de 50% nas Américas.<sup>3,5</sup> No Brasil, é endêmica em grande parte do território. No entanto, nas últimas duas décadas, ocorreram surtos esporádicos e não cíclicos de FA em regiões não-endêmicas, onde a vacinação não era recomendada anteriormente.<sup>6</sup> A Figura 1 mostra as regiões onde a vacinação para a FA é recomendada na América do Sul. De 2016 a 2019, houve uma importante epidemia no Sudeste do Brasil, em área densamente povoada, causada por vírus do genótipo Sul Americano 1, predominando, na cidade de São Paulo, a clade II-D.<sup>7</sup> Dados do Centro de Vigilância Epidemiológica do Estado de São Paulo mostram que, em 2017 foram confirmados 103 casos de FA em todo o Estado, entre autóctones e importados, com 47 (47,5%) óbitos; em 2018, 532 casos e 173 (34,3%) óbitos; em 2019, 72 casos e 12 (16,9%) óbitos.<sup>8</sup>

**Figura 1** - Mapa das regiões onde a vacinação para febre amarela é recomendada para viajantes na América do Sul.



Mapa da América do Sul mostrando a recomendação de vacinação para febre amarela para viajantes conforme a região. A cidade de São Paulo está na região em vermelho, com vacinação recomendada desde a epidemia de 2017. Fonte: Adaptado de CDC, 2019. <sup>9</sup>

A transmissão de FA no Brasil se dá por mosquitos do gênero *Haemagogus* e *Sabethes*, a partir de primatas não-humanos, no ciclo silvático. Na África, também ocorre o ciclo urbano, em que mosquitos do gênero *Aedes* transmitem o vírus de humanos para humanos. Com a urbanização, e conseqüente aproximação entre cidade e floresta, especialmente nas regiões de Mata Atlântica, descreve-se também o ciclo ecótono, em que há participação de mosquitos sinantrópicos (Figura 2).<sup>6,10</sup> A vacina 17D contra febre amarela é extremamente segura e eficaz, mas, em alguns casos, há reação adversa com manifestação clínica muito semelhante à da FA por vírus silvático. Este quadro é denominado doença viscerotrópica aguda associada à vacina febre amarela (DVA-VFA) e tem baixa incidência: em torno de 0,4 casos a cada 100.000 vacinados.<sup>1</sup> Igualmente rara é a doença neurológica associada à vacina febre amarela, que pode se manifestar com meningite, encefalite e doença inflamatória desmielinizante.<sup>1</sup>

**Figura 2** - Ciclos de transmissão da febre amarela

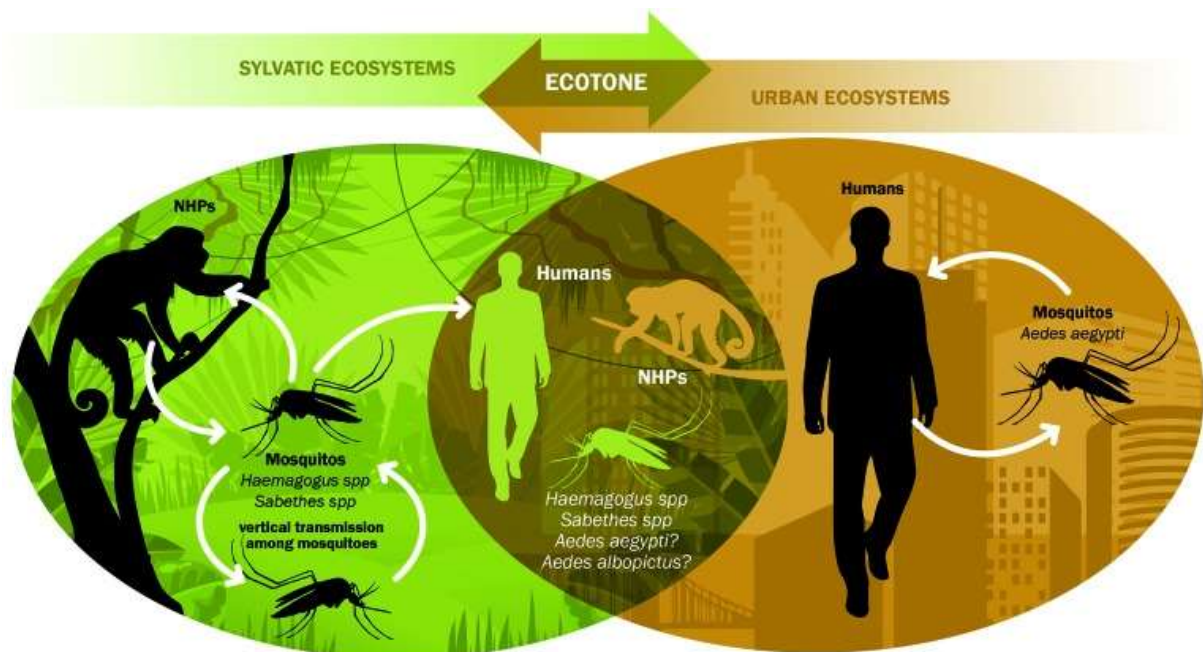


Ilustração mostrando ciclo silvático da FA, com transmissão do vírus entre primatas não humanos e humanos através dos mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes*; ciclo urbano com transmissão de humano para humano através de mosquitos do gênero *Aedes*; intersecção entre ciclos silvático e urbano da febre amarela, chamado de ciclo ecótono, em que ocorre transmissão de primatas não humanos a humanos através de mosquitos sinantrópicos em regiões próximas a centros urbanos. NHP: Primatas não humanos (traduzido de *non-human primates*). Fonte: Possas e cols., 2018 <sup>6</sup>



Após um período de incubação de cerca de 3-6 dias, a FA costuma manifestar-se inicialmente por uma fase virêmica, caracterizada por sintomas inespecíficos, como febre, adinamia, cefaléia, mialgia, náuseas e vômitos, com duração de poucos dias. Após a defervescência, a maioria dos pacientes apresenta remissão dos sintomas, enquanto cerca de 20% manifestam um período de intoxicação, causado por replicação do vírus dos tecidos, sobretudo no parênquima hepático. Nesta fase, aparecem as lesões orgânicas, em especial a hepatite aguda, que pode levar a icterícia, coagulopatia e encefalopatia. Apesar das predominantes manifestações hepáticas, a FA é uma doença sistêmica, em que outros órgãos podem ser gravemente afetados. Destacam-se o sistema renal, com insuficiência renal aguda, muitas vezes com necessidade de diálise, o hematológico, com linfopenia e plaquetopenia, o cardiovascular, com choque e arritmias, e o nervoso central, com confusão mental, convulsões e coma.<sup>11,12</sup>

## **1.2- Patologia de autópsia na febre amarela**

A autópsia foi historicamente uma ferramenta de grande importância na elucidação da patogênese de diversas doenças infecciosas. Na FA, alguns clássicos estudos de autópsia foram publicados no final do século XIX e início do XX. Os trabalhos de Councilman e Rocha-Lima descreveram a característica marcante da patologia hepática, que é a hepatite médio-zonal com corpúsculos eosinofílicos, que foram denominados corpúsculos de Councilman-Rocha Lima.<sup>13,14</sup> Outros autores importantes, como Torres, Vilela e Klotz & Belt, contribuíram com trabalhos seminais em patologia geral e hepática da FA.<sup>15-17</sup> Com o advento da microscopia eletrônica, Poon-King demonstrou vírions dentro de hepatócitos saudáveis e de corpúsculos de Councilman-Rocha Lima.<sup>18</sup>

A técnica de imunohistoquímica (IHQ) permitiu alguns avanços no conhecimento sobre a patogenia da FA. A saber, a demonstração de que os corpúsculos de Councilman-Rocha Lima são hepatócitos apoptóticos, por Quaresma e cols., e que há antígeno viral no parênquima hepático, renal e no miocárdio, por de Brito e cols.<sup>19,20</sup>. Mais recentemente, a biologia molecular contribuiu com a

demonstração da presença do RNA viral em diversos tecidos obtidos em autópsias de casos fatais de FA, através da reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa (RT-PCR).<sup>21-29</sup>

A patologia hepática sempre foi o principal foco dos estudos de autópsia, sendo ainda importante em trabalhos contemporâneos. A lesão hepática pode ser descrita como uma hepatite de predomínio na zona média, ou zona II de Rappaport, preservando as zonas periportal (III) e centrolobular (I). As duas principais alterações da célula hepática são a esteatose e a apoptose. Nota-se intensa esteatose macro e microvesicular, com células de aspecto “moruliforme”, localizadas preferencialmente na região médio-zonal, ou em todo o lóbulo hepático.<sup>13,14,16,17,20,26,30-34</sup> A apoptose é o principal mecanismo de morte celular na hepatite da FA.<sup>35</sup> Antígenos do vírus da FA são identificados em hepatócitos esteatóticos e apoptóticos e em células de Kupffer pela IHQ, e a RT-PCR detecta RNA viral no tecido hepático.<sup>19-26,28,29,36-40</sup> O infiltrado inflamatório no parênquima hepático é leve, desproporcional ao grau intenso de dano hepatocelular e as células de Kupffer apresentam hiperplasia, observando-se fagocitose de corpos apoptóticos.<sup>17,34</sup>

A patologia de outros órgãos e sistemas na FA é menos compreendida. Na maioria dos estudos, são encontradas alterações inespecíficas como edema e hemorragia, bem como anormalidades endoteliais. Nos rins é frequentemente descrita necrose tubular aguda, mas já foi encontrada também glomerulonefrite.<sup>19,26,28</sup> No baço, encontra-se usualmente atrofia folicular com depressão linfóide e descrição de hemofagocitose.<sup>26,28,41</sup> No sistema nervoso central já foi descrita encefalite, e nos pulmões, lesão pulmonar aguda.<sup>27,42,43</sup> Análises de IHQ e RT-PCR detectaram presença de componentes virais em pulmão, rins, baço, cérebro, pele, músculo esquelético, pâncreas e testículos.<sup>19,21,22,28,29,42,44</sup>

Do ponto de vista de avanços nas metodologias de autópsia, os estudos em FA, realizados na FMUSP durante a epidemia de 2017-2019, foram importantes para a descrição da autópsia minimamente invasiva guiada por ultrassom. A técnica foi empregada pela primeira vez durante a epidemia de uma doença infecciosa grave e mostrou equivalência à autópsia convencional na capacidade em diagnosticar a *causa mortis* imediata e básica. Tais estudos foram um preâmbulo ao que se veria

posteriormente, com o uso dessa forma de autópsia durante a pandemia de COVID-19.<sup>26,45,46</sup>

### **1.3- O coração na febre amarela**

Há poucos relatos na literatura acerca do comprometimento cardíaco na FA. Em meados do século XIX, o médico americano Jean Charles Faget descreveu uma bradicardia relativa, com uma frequência cardíaca desproporcional à elevação da temperatura, em pacientes com FA. Este achado propedêutico ficou conhecido como sinal de Faget e foi descrito posteriormente em outras doenças.<sup>47</sup> Mais recentemente, Paixão e cols. fizeram avaliação cardiológica clínica, laboratorial e de imagem em 70 pacientes internados por FA, e encontraram alterações eletrocardiográficas na maioria, bem como alterações ecocardiográficas morfológicas e de função ventricular em alguns casos. Ressonância magnética cardíaca foi realizada em 5 casos e apontou em padrão típico de miocardite um paciente, mostrando-se inalterada nos demais.<sup>48</sup> Uma coorte brasileira de pacientes com diagnóstico de FA admitidos em terapia intensiva mostrou alta prevalência de bradicardia (51%).<sup>49</sup> Ho e cols. coletaram retrospectivamente dados de pacientes internados na UTI de Moléstias Infecciosas do HC-FMUSP em 2018, e mostraram prevalência de 27% de arritmias ou miocardite, bem como elevado número de pacientes com bradicardias e dosagem média de troponina T discretamente elevada. Dois pacientes jovens (19 e 21 anos) previamente hígidos apresentaram disfunção ventricular (FE 35% e 40%) na avaliação ecocardiográfica.<sup>50</sup>

No âmbito dos estudos experimentais, Lloyd mostrou a ocorrência de bradicardia, bloqueios atrioventriculares e alterações de repolarização em primatas não-humanos.<sup>51</sup> Posteriormente, o mesmo autor descreveu a patologia do coração desses animais, demonstrando predominância de alterações degenerativas de distribuição irregular, sem predileção focal, com degeneração gordurosa, granular, hialina e vacuolar das fibras miocárdicas. Em alguns casos, descreveu áreas de miólise multifocal e pequenos focos hemorrágicos; em raros casos infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico perivascular.<sup>52</sup> Esses achados vão ao encontro do mostrado anteriormente por Cannel.<sup>53</sup> Outros autores descreveram alterações inespecíficas, em poucos animais, sendo as mais frequentes hemorragias e edema.<sup>54-57</sup>

No âmbito da patologia humana, estudos anteriores de autópsia demonstram que o coração de pacientes com FA apresenta edema, degeneração gordurosa (vacúolos de lipídios intracitoplasmáticos) e hemorragias epicárdicas e subendocárdicas.<sup>58,59</sup> Há algumas décadas, De Brito e cols.<sup>19</sup> demonstraram positividade de antígenos do vírus da FA em fibras miocárdicas através da técnica de IHQ. Este achado foi reproduzido posteriormente por DeSilva e cols..<sup>39</sup> A positividade para RNA viral por RT-PCR em tecido miocárdico também foi descrita por diversos autores.<sup>21,22,24</sup> Chan e cols. relataram achado de miocardite em autópsia de paciente com DVA-VFA; Fabro e cols. também descreveram miocardite em 2 pacientes com FA e lesão pulmonar aguda.<sup>22,42</sup> Paixao e cols. descreveram três casos submetidos à autópsia na sua coorte, dos quais dois apresentaram hemorragia epicárdica focal, enquanto um mostrou alterações compatíveis com miocardite aguda fúngica.<sup>48</sup> Durante a epidemia de FA de 2018-2019 alguns avanços foram feitos no entendimento da patologia sistêmica da doença, inclusive com achados particulares para o envolvimento cardíaco. Em dois trabalhos, foi descrita a patologia cardíaca encontrada em 20 casos fatais da doença. Os achados foram edema intersticial, hemorragia epicárdica e subendocárdica, miocardioesclerose, calcificação distrófica de fibras. Dois casos tinham miocardite de padrão misto, um dos quais com positividade para antígenos do vírus da FA em células inflamatórias.<sup>26,28</sup>

#### **1.4- O coração na sepse e nas arboviroses**

O coração é um dos órgãos frequentemente lesados na sepse, com prejuízo nas funções sistólica e diastólica. A injúria miocárdica induzida pela sepse está associada a um pior prognóstico.<sup>60</sup> A fisiopatologia é complexa e multifatorial, destacando-se, entre os mecanismos patogênicos, intensa inflamação, disfunção endotelial, isquemia tecidual, estresse oxidativo, disfunção mitocondrial e apoptose de cardiomiócitos.<sup>60-62</sup> Considerando a imunopatologia, diversos trabalhos mostraram a associação de elevados níveis de citocinas séricas com piora da função cardíaca, especialmente IL-1 $\beta$  TNF- $\alpha$  e IL-6, mediadores inflamatórios de importância na resposta inflamatória inicial.<sup>60,61,63</sup> Um estudo com análise multiplex mostrou a disfunção miocárdica pela sepse se correlacionou o número de determinados mediadores inflamatórios aumentados, que se agrupam em um mesmo *cluster*

(CD40L, IL-8, MCP-1, IL-1RA, IL-6, IL-15, TNF- $\alpha$ , sST2, granzima e HSP70).<sup>64</sup> A infiltração de macrófagos no tecido miocárdico também está associada à lesão cardíaca.<sup>63</sup> A Tabela 1 apresenta os principais marcadores de interesse para a imunopatologia da injúria miocárdica induzida pela sepse.

**Tabela 1** - Marcadores de interesse para a imunopatologia do coração da sepse

(continua)

<b>Componente do sistema imune</b>	<b>Função geral no Sistema imune</b>	<b>Papel na lesão cardíaca pela sepse</b>
Macrófagos	Fagocitose, apresentação de antígeno, digestão lisossômica e liberação de citocinas. São parte da resposta imune inata, mas também participam da resposta adaptativa.	Produção de citocinas inflamatórias (IL-1, IL-6, IFN- $\gamma$ e radicais livres de oxigênio, que contribuem para diminuição da contratilidade e morte celular dos cardiomiócitos.
Célula NK	Atividade citotóxica, produção inicial de IFN. Parte da imunidade inata. Importante contra vírus e patógenos intracelulares.	Papel pouco conhecido. Pode estar atrelada a resposta imune exacerbada como também exercer papel regulatório protetor.
Linfócito T CD4+	Linfócitos T <i>helper</i> , podem maturar em diversas subpopulações, com funções variadas. Liberam citocinas inflamatórias, que são importantes na diferenciação de linfócitos B, ativação de linfócitos T citotóxicos e na melhora da atividade fagocítica de macrófagos e neutrófilos. São parte da resposta imune adaptativa.	Produção de citocinas inflamatórias, contribuindo para a “tempestade de citocinas”. Ativação de macrófagos.
Linfócitos T CD8+	Atividade citotóxica similar à das células NK, das quais são a equivalente da imunidade adaptativa.	Pouco conhecida. Produção de IFN- $\gamma$ .

(continuação)

<b>Componente do sistema imune</b>	<b>Função geral no Sistema imune</b>	<b>Papel na lesão cardíaca pela sepse</b>
TNF- $\alpha$	Citocina pró-inflamatória potente liberada na fase inicial da resposta imune por macrófagos, linfócitos T e células NK. Induz a produção de moléculas de adesão, migração celular, ativação de células imunes efectoras e produção de proteínas de fase aguda no fígado. Inibe a proliferação celular e induz apoptose. Relacionada à resposta Th1.	Uma das principais citocinas associadas à lesão cardíaca pela sepse. Leva à inibição da contratilidade e apoptose de cardiomiócitos, além da ativação do sistema nervoso simpático.
IFN- $\gamma$	Citocina pró-inflamatória liberada principalmente por células NK e linfócitos T CD4+ e CD8+, mas também por macrófagos. É fundamental para a ativação dos macrófagos na defesa contra patógenos intracelulares e intravesiculares como as micobactérias, fungos de micoses profundas e parasitos intracelulares como a Leishmania e o Toxoplasma, entre muitos outros. É importante na diferenciação dos linfócitos T CD4+ em Th1 e ativação das células NK. Estimula a produção de TNF- $\alpha$ . Estimula a produção de agentes oxidantes e proteínas do choque térmico.	Tem papel importante na lesão cardíaca pela sepse. Estimula produção de TNF- $\alpha$ e espécies reativas de oxigênio. Causa depressão cardíaca.

(continuação)

Componente do sistema imune	Função geral no Sistema imune	Papel na lesão cardíaca pela sepse
IL-1 $\beta$	Citocina pró-inflamatória, relacionada à imunidade inata liberada na resposta inicial a patógenos. É produzida por macrófagos. Estimula a produção de TNF- $\alpha$ e tem papel na ativação dos linfócitos T. Também ativa iNOS e COX-2	Fortemente associada à lesão cardíaca pela sepse. Ativa a resposta inflamatória, estimulando a produção de citocinas deletérias aos cardiomiócitos e de espécies reativas de oxigênio. Também inibe diretamente a função miocárdica.
IL-6	Citocina pró-inflamatória, liberada na fase inicial da resposta imune por diversos tipos celulares, como macrófagos, células endoteliais e musculares. Estimula a produção de proteína C reativa e de TNF- $\alpha$ . Está relacionada à resposta imune inata e adaptativa.	Associada à lesão cardíaca induzida pela sepse, através da ativação do sistema nervoso simpático e do estímulo à liberação de TNF- $\alpha$ .
IL-8	Citocina pró-inflamatória liberada na fase aguda da resposta imune às infecções. É produzida por macrófagos e neutrófilos. Tem função de quimiotaxia, com recrutamento de neutrófilos.	Tem alguma associação com lesão cardíaca pela sepse, embora o seu papel seja menos elucidado. Faz parte do status hiper-inflamatório relacionado à sepse.
IL-12	Citocina pró-inflamatória liberada na fase aguda da resposta imune por macrófagos e células dendríticas. Indutora da resposta Th1, estimula a produção de IFN- $\gamma$ e a atividade citotóxica.	Há algumas evidências experimentais de associação com a lesão cardíaca, potencialmente por perpetuar a resposta inflamatória exacerbada Th1.

(conclusão)

<b>Componente do sistema imune</b>	<b>Função geral no Sistema imune</b>	<b>Papel na lesão cardíaca pela sepse</b>
IL-4	Citocina anti-inflamatória, produzida por linfócitos Th2. Atua ativando linfócitos B na produção de anticorpos e inibindo a produção de citocinas pró-inflamatórias.	Há poucas evidências do papel da IL-4 na lesão cardíaca induzida pela sepse.
IL-10	Citocina anti-inflamatória, produzida por macrófagos, Treg e células dendríticas. Tem função importante na resposta imune, inibindo TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-6. Inibe a atuação de linfócitos T e macrófagos ativados.	Há poucas evidências do seu papel na lesão cardíaca pela sepse. Tem potencial papel protetor.
MCP-1 ou CCL2	Quimiocina relacionada ao recrutamento, ativação e diferenciação de macrófagos.	Promove infiltrado inflamatório, levando à inflamação e morte celular
MIP-1 $\beta$ ou CCL4	Quimiocina relacionada ao recrutamento de linfócitos e ativação de macrófagos	Sua relação com lesão cardíaca pela sepse é pouco conhecida
IP-10 ou CXCL10	Quimiocina relacionada ao recrutamento de linfócitos T, macrófagos e células NK, e à produção de outras citocinas inflamatórias	Há poucas evidências; poderia contribuir para aumento do processo inflamatório
GM-CSF	Citocina produzida por macrófagos e linfócitos. Estimula a produção de neutrófilos e monócitos.	Pode impactar na lesão do miocárdio por neutrófilos. Há poucas evidências

TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon, IL: interleucina; MCP-1: *monocyte chemoattractant protein 1*; MIP-1 $\beta$ : *macrophage inflammatory protein 1 - beta*; IP-10: proteína 10 induzida por interferon gama; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos



Há evidência de acometimento do coração por outras arboviroses. Uma revisão sobre Zika e complicações cardiovasculares identificou um relato de caso publicado de miocardite aguda, bem como uma coorte prospectiva de 9 pacientes pós infecção aguda que evoluíram com arritmias, derrame pericárdico e insuficiência cardíaca, além de um estudo em modelo animal que mostrou presença de RNA viral em tecido cardíaco.<sup>65-67</sup> Na chikungunya também foi descrita miocardite, arritmia e alterações cardiovasculares.<sup>68,69</sup> Nagaratnam e cols. descreveram três casos miopericardite em pacientes com dengue.<sup>70</sup> Mais recentemente, Miranda e cols. descreveram um caso fatal com miocardite por dengue, com demonstração histopatológica do infiltrado linfomonocítico em tecido miocárdico e de partículas virais no interstício e no interior de cardiomiócitos por microscopia eletrônica.<sup>71</sup>

A dengue também tem como importante mecanismo fisiopatológico a lesão endotelial, com extravasamento capilar, especialmente no leito esplâncnico, levando a uma hipovolemia relativa, que explica parte da fisiopatologia do choque nesta doença.<sup>72</sup> Esta lesão tem como um de seus mecanismos a interação da proteína viral NS1 com elementos do glicocálix, levando à sua disfunção e consequente elevação de biomarcadores associados, como syndecan-1 e endocan.<sup>73-75</sup> O glicocálix também mostrou-se precocemente lesado em outras condições, como após isquemia regional em cirurgias vasculares, que também cursou com importante elevação de syndecan-1, enquanto níveis de VCAM-1 e ICAM-1 permaneceram estáveis.<sup>76</sup> Na sepse também foi observada elevação de syndecan-1 em comparação com controles saudáveis, assim como de outros marcadores de lesão endotelial, como antitrombina, PAI-1, VCAM-1, E-selectina, endogлина e endotelina-1.<sup>77-79</sup> A Tabela 2 apresenta marcadores de interesse para a lesão endotelial associada à sepse e às arboviroses.

**Tabela 2** - Marcadores de interesse para a fisiopatologia da lesão endotelial do coração na sepse e arboviroses

(continua)

<b>Biomarcador</b>	<b>Papel na fisiologia endotelial</b>	<b>Comportamento na lesão endotelial associada a doenças infecciosas</b>
VEGF	É um fator de crescimento vascular que estimula a migração e proliferação de células endoteliais, sendo importante na angiogênese. Tem como subtipos o VEGF-C e o VEGF-A.	Pode estar elevado frente à hipóxia tecidual, contribuindo para a permeabilidade vascular.
Endogлина	É uma proteína transmembrana expressa por células endoteliais com funções relacionadas à angiogênese	Pode estar aumentada na sepse e dengue.
Angiopietina-2	É um fator de crescimento vascular, produzido por células endoteliais.	Pode estar elevado na sepse e na dengue.
Endotelina	Proteína vasoativa, importante na regulação da pressão arterial, produzida por células endoteliais	Pode estar elevada na sepse e na dengue.
Endocan	Peptídeo importante na angiogênese.	Estudos sugerem associação com disfunção endotelial em diversas patologias, como a sepse.
Syndecan-1	Proteína transmembrana presente em vários tipos celulares, como nas células endoteliais. Regula a interação entre célula e matriz extracelular.	Pode estar elevado em diversas situações de choque, em especial na dengue, mostrando lesão do glicocálix.
VCAM-1	Molécula de adesão celular, que media o recrutamento de linfócitos, monócitos, eosinófilos e basófilos no endotélio vascular.	Níveis elevados geralmente refletem inflamação e eventual lesão endotelial.

(conclusão)

<b>Biomarcador</b>	<b>Papel na fisiologia endotelial</b>	<b>Comportamento na lesão endotelial associada a doenças infecciosas</b>
ICAM-1	Molécula de adesão celular, importante no recrutamento de leucócitos no endotélio vascular	Níveis elevados geralmente refletem inflamação e eventual lesão endotelial
Fator tecidual	Proteína de ativação da cascata de coagulação	Pode estar elevado, especialmente na sepse quando há coagulação intravascular disseminada
PAI-1	Proteína que inibe a atuação do plasminogênio, reduzindo a fibrinólise.	Pode estar elevado na sepse, contribuindo para a hipercoagulabilidade
Fibrinogênio	Proteína plasmática que é convertida em fibrina durante a formação de trombos	Pode estar elevado na sepse e dengue graves
vWF-A2	Proteína sintetizada nas células endoteliais e megacariócitos, mediador da adesão plaquetária.	Aumento dos seus níveis séricos pode estar associado a CIVD na sepse.
Trombomodulina	Proteína de membrana das células endoteliais, tem papel anti-trombótico	Pode estar elevada em casos graves de sepse

VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule 1*; ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*; PAI-1: inibidor de ativação de plasminogênio; vWF-A2: fator de von Willebrand A2

A despeito de estudos centenários de autópsia em FA, o acometimento do coração pela doença segue pouco compreendido. Os estudos mais antigos e com maior amostra carecem do uso de técnicas e padronizações modernas, enquanto estudos mais recentes são quase todos restritos a relatos ou pequenas séries de casos. Os mecanismos patológicos que explicariam os achados clínicos descritos na FA permanecem em grande parte desconhecidos. A compreensão desses

mecanismos em outras doenças infecciosas, como as arboviroses e a sepse, oferece oportunidades para investigação da patogênese do acometimento cardíaco pela febre amarela. A hipótese deste estudo é que haja alterações cardíacas relacionadas ao vírus da febre amarela no miocárdio e no endotélio de casos fatais pela doença.

## **2-OBJETIVOS**

---

**2.1- Determinar e descrever os achados da patologia do coração de casos fatais de FA, internados no Hospital das Clínicas, durante a epidemia de 2017-2019**

- 2.1.1- Descrever os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, laboratoriais, eletrocardiográficos e ecocardiográficos dos pacientes;
- 2.1.2- Descrever os achados macroscópicos cardíacos, bem como as alterações histopatológicas e ultraestruturais em amostras teciduais cardíacas desses pacientes;
- 2.1.3- Avaliar, com técnicas de imunohistoquímica, e comparar com controles o imunofenótipo celular, a presença de antígeno viral e marcadores de lesão vascular em cortes histológicos do coração desses pacientes;
- 2.1.4- Avaliar, pela reação em cadeia da polimerase via transcriptase reversa quantitativa (RT-qPCR), a presença de RNA do vírus da FA no tecido cardíaco desses pacientes;
- 2.1.5- Avaliar e comparar com controles a proteômica de fragmentos do coração desses pacientes, com enfoque no perfil de citocinas inflamatórias e de marcadores de lesão endotelial.
- 2.1.6- Descrever os achados da patologia do coração dos casos de DVA-VFA

## **3-MÉTODOS**

---

### **3.1- Desenho do estudo e critérios de inclusão**

Foi realizado um estudo retrospectivo de autópsias de pacientes com diagnóstico de FA. O estudo foi aprovado pela Comissão de Ética em Pesquisa (CEP) do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP); número do processo: 4.354.375 (ANEXO A). A autópsia é um procedimento médico. No ICHC-FMUSP há um informe, assinado por responsáveis e familiares do paciente falecido, para a realização do estudo anatomopatológico (ANEXO B). Como o presente estudo é retrospectivo, não envolve experimentação direta ou entrevista com pacientes e familiares, foi dispensado o preenchimento de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Foram incluídos pacientes com diagnóstico confirmado de FA submetidos à autópsia no Serviço de Verificação de Óbito da Capital da Universidade de São Paulo (SVOC-USP) entre 2017 e 2019. Foi utilizada a definição de caso suspeito determinada pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo e Ministério da Saúde, Brasil (ANEXO C), associada a confirmação por método sorológico, molecular (RT-PCR) ou imunohistoquímica tecidual. Pacientes DVA-VFA foram incluídos. A DVA-VFA foi definida com base nos mesmos critérios diagnósticos de FA, associado à identificação da cepa vacinal do vírus da FA por RT-PCR e da não identificação da cepa silvática.

Para algumas análises, foram incluídas como controles amostras de autópsias de pacientes falecidos por sepse e doenças cardiovasculares, obtidas nos arquivos de autópsia do Departamento de Patologia da FMUSP.

### **3.2- Dados demográficos e clínicos**

A coleta de dados demográficos e clínicos foi realizada através de revisão de prontuários. Foram coletados sexo, idade, antecedentes clínicos, intervalos entre início dos sintomas, internação e óbito, intercorrências cardiovasculares e infecciosas na internação, intervenções terapêuticas relevantes. Também foram revisados exames complementares realizados durante a internação: eletrocardiograma (ECG), ecocardiograma, troponina e NT-proBNP. Em relação aos ECG, foram coletados



todos os traçados de 12 derivações, laudados de forma independente por 2 cardiologistas, comparados os laudos e resolvidas as discordâncias por consenso.

### **3.3- Análise de macroscopia e histopatologia do coração**

As autópsias realizadas no Departamento de Patologia do HC-FMUSP seguem as técnicas de Virchow (retirada, dissecação e exame de cada órgão individualmente) ou Letulle (retirada e dissecação dos órgãos em monobloco), ambas com representação de todos os órgãos de forma sistemática. Os corações foram examinados externamente, pesados e seccionados para observação do interior das 4 câmaras cardíacas. Sistemáticamente, dois cortes foram representados para cada caso, um corte da parede lateral do ventrículo direito e outro corte da parede lateral do ventrículo esquerdo. Todas as coronárias foram seccionadas para a observação de placas ateromatosas obstrutivas. Os tecidos coletados foram fixados em formalina tamponada a 10% e processados para emblocagem em parafina. Posteriormente, foram realizados cortes histológicos de 4µm de espessura. Mais amostras de tecidos da parede livre do ventrículo esquerdo (VE) foram obtidas para congelação imediata em nitrogênio líquido e posterior armazenamento em freezers a -80°C. Os cortes histológicos foram rotineiramente corados pela hematoxilina-eosina. Outras colorações, como Tricrômico de Masson, Ácido Periódico de Schiff (PAS) e Grocott foram realizadas em casos específicos, conforme indicação do patologista.

Os dados da avaliação macroscópica dos corações foram obtidos através da revisão dos laudos da autópsia, confeccionados pelo médico patologista que realizou o procedimento. Foram coletadas medidas, dentre as quais peso do coração, espessura das paredes ventriculares, diâmetros das valvas cardíacas, e foram revisados achados macroscópicos em epicárdio, cavidades cardíacas, valvas, coronárias e aorta.

A histopatologia cardíaca foi revisada por um patologista especialista em autópsia e por um cardiologista clínico, de forma sistemática. Posteriormente, as principais alterações foram discutidas com um patologista especialista. Foram avaliadas em cada caso as seguintes alterações: a) miocardioesclerose, definida pela presença de fibrose intersticial sem perda de cardiomiócitos, sendo classificada em leve, quando a fibrose é predominantemente perivascular, em moderada, quando a fibrose é intramiocárdica multifocal, e intensa, quando a fibrose é intramiocárdica

difusa; b) hipertrofia de cardiomiócitos, definida por aumento das dimensões do cardiomiócitos ou aumento, hipercromia e alteração da posição do núcleo; c) miocardite, definida infiltrado de células inflamatórias associado a degeneração ou necrose de fibras cardíaca, sendo classificada em focal, multifocal e difusa; d) necrose de fibras miocárdicas, definida por alterações compatíveis com morte celular, como perda da solução de continuidade da membrana do cardiomiócito, calcificações distróficas, perda do núcleo, alteração em banda de contração, hipereosinofilia do cardiomiócito; e) alterações endoteliais, definida como leve quando há tumefação das células endoteliais, como moderada em caso de necrose fibrinóide, e como grave se houver vasculite ou trombo; f) aterosclerose coronariana, definida pela presença de placas de ateroma na luz das artérias coronárias; g) hemorragia intersticial, definida pela presença de hemácias no interstício cardíaco, fora do lúmen vascular; h) epicardite, definida pela presença de infiltrado inflamatório no epicárdio; i) outros achados considerados relevantes. As definições foram adaptadas de recomendações internacionais de especialistas e tratados de patologia consagrados.<sup>80-83</sup>

Foi realizada representação histológica do sistema de condução elétrico do coração em 8 casos. Para avaliação do nó sinoatrial (NSA), foi coletada amostra de tecido na desembocadura da veia cava superior para o átrio direito, na face lateral, sobre o sulco terminal. O NSA localiza-se a menos de 1 mm abaixo do epicárdio. Histologicamente, o NSA é constituído por um aglomerado de células especializadas, com morfologia de cardiomiócitos modificados, dispostas em feixes sem nenhuma característica particular, porém imersas em tecido conjuntivo denso e irrigadas pela artéria do nó sinoatrial. Para avaliação do nó atrioventricular (NAV), do feixe de His e de seus ramos, foi coletada amostra na região do triângulo de Koch. Este triângulo está situado na transição atrioventricular das câmaras cardíacas direitas, definido a partir de linhas traçadas pela inserção da cúspide septal da valva tricúspide e do tendão de Todaro, sendo que, na sua base, encontram-se a abertura do seio coronário e, no seu ápice, o septo membranoso. Na análise histológica, as células que compõem o NAV agrupam-se em região próxima do vértice do triângulo de Koch, posicionando-se no subendocárdio do átrio direito. São cardiomiócitos especializados, com menor diâmetro e menor quantidade de miofilamentos que os contráteis. Mais anteriormente, o nó compacto progressivamente se interioriza em direção ao corpo fibroso central, até que se torna o feixe penetrante (feixe de His), completamente circundado pelo

tecido conjuntivo dessa parte do esqueleto fibroso do coração, atravessando a transição AV em direção aos ventrículos. O primeiro ramo é o esquerdo, situado no subendocárdio da face esquerda do septo ventricular, também completamente envolto por tecido conjuntivo fibroso. O ramo direito é a continuação direta do feixe ramificante após a completa emergência do ramo esquerdo. Como, em geral, o feixe está situado mais à esquerda, o ramo direito penetra na espessura do septo, circundado por tecido conjuntivo, emergindo no subendocárdio do ventrículo direito (VD), junto à base da trabécula septomarginal, com trajeto no comprimento da banda moderadora.<sup>84,85</sup> Os cortes realizados foram corados por hematoxilina-eosina e tricrômico de Masson. Todos os cortes foram revisados em conjunto com um especialista em patologia cardíaca.

### **3.4- Análise de imunohistoquímica**

Foram pesquisados em cortes histológicos de tecido cardíaco os seguintes antígenos: antígenos do vírus da FA (IgM humana policlonal anti- vírus da FA fornecido pelo Instituto Pasteur-Dakar, originalmente padronizado para ensaio de imunoabsorção enzimática [ELISA] e validado na diluição otimizada de 1:20.000 com controles positivos e negativos), CD68 (macrófago ativado), CD45 (leucócitos), CD4 (linfócito T *helper*), CD8 (linfócito T citotóxico), CD57 (linfócito NK) e angiopoietina-2.<sup>86</sup> Foi realizado protocolo de imunohistoquímica em cortes de casos selecionados de FA, incluindo todos os casos de miocardite viral, todos os casos de DVA-VFA, bem como casos de FA em pacientes jovens, sem comorbidades, com injúria miocárdica clinicamente detectada (troponina T positiva). Também foram avaliados controles com sepse e morte cardiovascular. Foi realizada análise quantitativa para CD68, CD45, CD57, CD4, e CD8, com contagem de células positivas em 30 campos de grande aumento (400x); e semi-quantitativa para a antígenos do vírus da FA e angiopoietina-2.

O protocolo de imunohistoquímica seguiu os passos seguintes. Os cortes foram colocados em lâminas silanizadas (Sigma Chemical Co. St. Louis, Missouri, EUA) em suporte adequado. O processo de desparafinização consistiu em colocar as lâminas em xilol quente, em estufa a 60 – 65° C, durante 15 minutos e depois em 2 banhos de xilol frio, seguidos de dois banhos de álcool absoluto, um banho de álcool 95° e um

banho de álcool 70°, em seguida, foram lavadas em água corrente deionizada. A recuperação dos sítios antigênicos foi realizada a 125°C em panela Pascal, alta temperatura em CITRATO pH 6. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito através da água oxigenada 10v (3%), 4 banhos de 5 minutos cada e, para o anticorpo CD4, o bloqueio foi feito em água oxigenada (3%) e PBS por 10 min. Novamente as lâminas foram lavadas em água corrente e água destilada e imersas em tampão tris-fosfato pH 7.4 (TBS). A incubação das amostras nos anticorpos primários foi realizada "overnight" a 4°C em câmara úmida, com os anticorpos nas concentrações descritas na Tabela 3. Posteriormente foram lavadas em TRIS e incubadas com o anticorpo secundário HRP/DAB IHC micropolymer (ab 236466; ABCAM, Cambridge, UK) em estufa 37°C, por 30 minutos. Para a revelação, foi utilizado como cromógeno Diaminobenzidina (DAB), e para a contra-coloração, Hematoxilina de Harris (Merck, Darmstadt, Alemanha), sendo então montadas com Permount.

Todas as reações de IHQ foram realizadas no Laboratório de Imunohistoquímica do Departamento de Patologia-FMUSP.

**Tabela 3** - Características e concentração dos anticorpos utilizados para as reações de imunohistoquímica

Anticorpo	Concentração	Marca	Clone	Código
CD68	1:5000	Dako	DGH1	M0876
CD45	1:2000	Dako	PD7/26	M701
CD4	1:150	Novocastra	4B12	NCL-CD4 368
CD8	1:400	Dako	C8/144B	M7103
CD57	1:200	Dako	TB01	M7271
Ang-2	1:50	Santa Cruz	F1	sc-74403

Ang-2: angiopoietina-2

### 3.5- Microscopia eletrônica

Foi realizada avaliação por microscopia eletrônica de transmissão em casos selecionados de FA. Amostras de tecido cardíaco previamente fixadas em

glutaraldeído a 3% foram processadas, conforme protocolo previamente descrito.<sup>87</sup> Os cortes finos foram analisados ao microscópio eletrônico de transmissão (Philips Tecnai 10, Hillsboro, OR, EUA, 80 kV), associado ao Laboratório de Biologia Celular (LIM 59) da FMUSP.

### **3.6- Detecção e quantificação de RNA viral**

Foi realizada RT-qPCR em amostras de tecido cardíaco fresco congelado. Fragmentos de 1cm<sup>3</sup> foram macerados, seguido de extração do ácido nucleico utilizando tiocianato de guanidina (TRIzol, Life Technologies, Carlsbad, CA, USA). Foram então utilizados reagentes apropriados para RT-qPCR (AgPath-ID one-step RT-PCR reagentes, Ambion, Austin, TX, USA) com primers e sondas específicos descritos anteriormente.<sup>88</sup> As reações de RT-qPCR consistiram em um passo de transcrição reversa, a 45°C por 10 min para ativação enzimática mais 95°C por 10 min, e 40 ciclos a 95°C por 15 segundos mais 60°C por 45 segundos para hibridização e extensão, com uso do equipamento ABI7500 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA).

Todas as reações de RT-qPCR foram realizadas no Laboratório de Evolução Molecular e Bioinformática (LEMB), do Departamento de Microbiologia do Instituto de Ciências Biomédicas II (ICB II), USP.

### **3.7- Análise proteômica via imunensaio multiplex**

Foi realizada avaliação de fragmentos de VE para quantificação de proteínas relacionadas à resposta imune (GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IL-12p70, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$ ) e à função endotelial, hemostasia e trombose (angiopietina-2, endoglina, endotelina-1, VEGF, VEGF-A, VEGF-C, fator tecidual, endocan, syndecan-1, trombomodulina, troponina i, VCAM-1, ICAM-1, PAI-1, vWF-A2). Foi utilizada metodologia de imunensaio multiplex. As reações de foram realizadas no Laboratório de Medicina Laboratorial (LIM-03) da FMUSP.

### **3.7.1- Extração das proteínas do tecido cardíaco**

O tecido cardíaco congelado a fresco, armazenado em  $-80^{\circ}\text{C}$ , foi cortado em fragmentos de  $10\text{ mm}^3$  e processado de acordo com as instruções do kit de extração (Bio-plex™ Cell Lysis Kit, Bio-rad Laboratories, Hercules, CA, USA). O fragmento de tecido foi lavado uma vez com o tampão de lavagem celular e, em seguida, transferido para um microtubo de 2mL onde foi adicionado 500  $\mu\text{L}$  de solução de lise celular. Após isso, as amostras foram para equipamento disruptor de células e tecidos (FastPrep-24™ 5G lysis system, MP Biomedicals, Fisher Scientific, Irvine, CA, EUA) por 2 ciclos (6,5m/s, 40 segundos, temperatura ambiente), com esferas cerâmicas de 6.35mm (MP Biomedicals) próprias para o equipamento utilizado. Finalizado o processo de lise do tecido, as amostras foram centrifugadas a 14.000 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi aliqotado em 2 microtubos de 1,5mL e o sedimento foi descartado. As amostras foram armazenadas em freezer a  $-20^{\circ}\text{C}$  para posterior dosagem das proteínas totais e das proteínas de interesse.

A dosagem de proteínas totais foi realizada pelo método colorimétrico automatizado, utilizando kit (TP2, Roche diagnostics GmbH, Mannheim, Alemanha) e equipamento (COBAS C111, Roche Instrument Center, Rotkreuz, Suíça) próprios, objetivando a normatização dos resultados das proteínas de interesse.

### **3.7.2- Quantificação proteica por imunoensaio multiplex**

Foi realizado imunoensaio multiplex utilizando a tecnologia xMAP (*Multiple Analyte Profiling*) da Luminex®, que possibilita quantificar diversos biomarcadores simultaneamente, em uma pequena quantidade de amostra biológica, e em ampla diversidade de matrizes biológicas. Essa tecnologia possui princípio similar ao ELISA sanduíche, porém utiliza microesferas coloridas fluorescentes (*beads*) que se ligam, de forma covalente, aos anticorpos de captura. Os anticorpos de captura são colocados diretamente contra o biomarcador desejado. Após uma série de lavagens, para remoção de proteínas não ligadas, anticorpos de detecção são adicionados para criar o complexo sanduíche, e posteriormente adição do conjugado estreptavidina-ficoeritrina (Figura 3).

**Figura 3** - Esquema ilustrativo do complexo sanduíche no imunoenensaio multiplex



Esquema ilustrativo do complexo microesfera, anticorpo de captura, biomarcador de interesse do estudo, anticorpo de detecção e estreptavidina-ficoeritrina no ensaio xMAP da Luminex®. Fonte: imagem gentilmente cedida por Caroline Silvério Faria, Laboratório de Medicina Laboratorial (LIM-03), FMUSP.

Para realização do ensaio, as amostras foram descongeladas e centrifugadas a 4500 rpm em temperatura ambiente por 5 minutos.

Para dosagem de GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-12p70, IL-17A, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ , TNF- $\alpha$  e VEGF foi utilizado kit apropriado (Milliplex Map Kit Human Cytokine/Chemokine Magnetic Bead Panel, Millipore Corp., Billerica, MA, USA); para Angiopoietina-2, Endoglina, Endotelina-1, IL-8, VEGF-A e VEGF-C foi utilizado outro kit (Milliplex Map Kit Human Angiogenesis/Growth Factor Magnetic Bead Panel 1, Millipore Corp., Billerica, MA, USA), para PAI-1 foi utilizado kit específico (Milliplex Human Sepsis Magnetic Bead Panel 1, Millipore Corp., Billerica, MA, USA), para vWF-A2 foi utilizado kit específico (Milliplex Human Cardiovascular Disease Bead Panel 4, Millipore Corp., Billerica, MA, USA), para fibrinogênio foi utilizado kit específico (Milliplex Map Kit Human Cardiovascular Disease Magnetic Bead Panel 3 Acute Phase, Millipore Corp., Billerica, MA, USA), para fator tecidual, endocan, syndecan-1, trombosmodulina, troponina i, VCAM-1 e ICAM-1 foi utilizado kit customizado (Human Luminex Discovery Assay 7 PLEX, R&D Systems, Minneapolis, MN, USA).

Para reconstituição do padrão e montagem da curva, diluições de microesferas, amostras, anticorpos, estreptavidina-ficoeritrina, solução de lavagem foram seguidas as instruções da bula de cada kit, de acordo com o fabricante.

Foram pipetadas 25 $\mu$ L das amostras dos pacientes, controles e curva padrão, branco, em seguida foram adicionados 25 $\mu$ L de microesferas coloridas revestidas com

anticorpos de captura contra os biomarcadores de interesse em uma placa com 96 poços e incubadas em agitador de placas (IKA MTS 2/4 digital), por 16 horas. No dia seguinte, após lavagens, o anticorpo de detecção foi adicionado à placa, que passou por 1 hora de incubação no agitador de placas. As lavagens foram realizadas em uma lavadora magnética (Bio-plex PRO II Wash Station) e as microesferas permanecem retidas na placa pela ação de um ímã. Foi adicionada, posteriormente, 25µL de estreptavidina-ficoeritrina, que emite sinal fluorescente quando excitado por diodo emissor de luz (LED, do inglês *light emitting diode*) do equipamento de leitura, e incubada por 30 minutos. Após um último ciclo de lavagem para remoção dos reagentes não aderidos, foi adicionada aos poços 150µL solução tampão para ressuspensão das microesferas e em seguida a placa foi colocada no equipamento leitor de microesferas Magpix Milliplex (Luminex Corp, Austin, Texas, USA), onde 2 LEDs, um verde com comprimento de onda de 525nm identifica os biomarcadores, e um LED vermelho (635nm) identifica as microesferas; e uma câmera com dispositivo de carga acoplado (CCD, do inglês *charge-coupled device*) captura essas imagens e envia para o software Xponent 4.2 (Luminex Corp, Austin, Texas, USA). Posteriormente, a análise dos dados é realizada pelo software Milliplex Analyst 5.1 (EMD Millipore). As etapas de montagem da placa e posterior análise podem ser visualizadas na Figura 4.



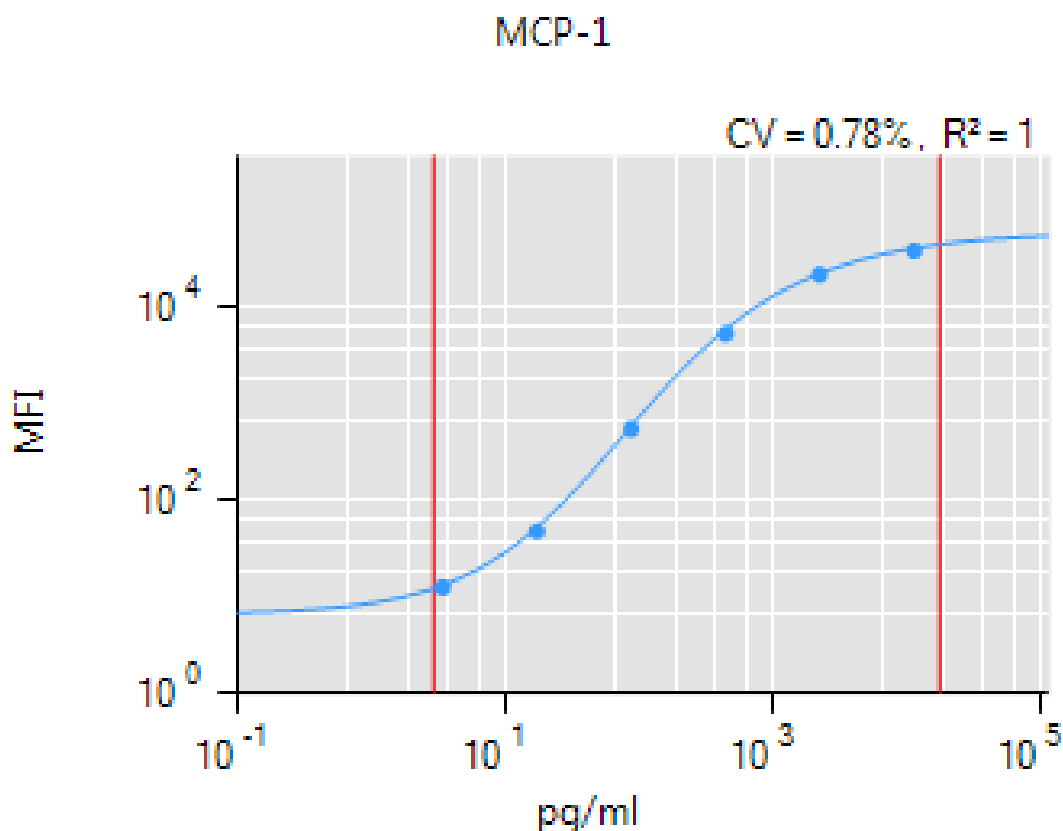
**Figura 4** - Esquema ilustrativo das etapas do imunoenensaio multiplex



Esquema ilustrativo das etapas de montagem da placa até análise final dos dados obtidos no ensaio xMAP da Luminex®. Fonte: imagem gentilmente cedida por Caroline Silvério Faria, Laboratório de Medicina Laboratorial (LIM-03), FMUSP

As concentrações dos biomarcadores foram determinadas com base no ajuste da curva padrão para a intensidade média de fluorescência (MFI, do *inglês media fluorescence intensity*) versus pg/mL. Os níveis dos biomarcadores foram expressos em pg/mL de acordo com a curva padrão obtida no ensaio (Figura 5).

**Figura 5** - Exemplo de curva de detecção do imunensaio multiplex



Exemplo de curva de MCP-1 em 5-Plog pelo ensaio xMAP da Luminex®. Fonte: imagem gentilmente cedida por Caroline Silvério Faria, Laboratório de Medicina Laboratorial (LIM-03), FMUSP.

### 3.8- Análise estatística

Os dados foram coletados e armazenados em planilhas (Microsoft Excel 2013). Os dados foram descritos em números inteiros e proporções (dados qualitativos), média com desvio padrão (dados quantitativos paramétricos) e mediana com percentil 25 e 75% (dados quantitativos não paramétricos), quando apropriado. As comparações entre dois grupos foram realizadas com o teste de Wilcoxon Rank-Sum / Mann-Whitney, e, entre três grupos, utilizando teste de Kruskal-Wallis, seguido de teste post-hoc de Dunn, quando houvesse significância estatística, com correção pelo método de Benjamini-Hochberg. O valor de  $P$  abaixo de 0,05 foi considerado como significativo estatisticamente. A análise estatística foi feita utilizando-se o programa *R* versão 4.1.2. Os gráficos foram gerados utilizando-se o pacote *ggplot2*.

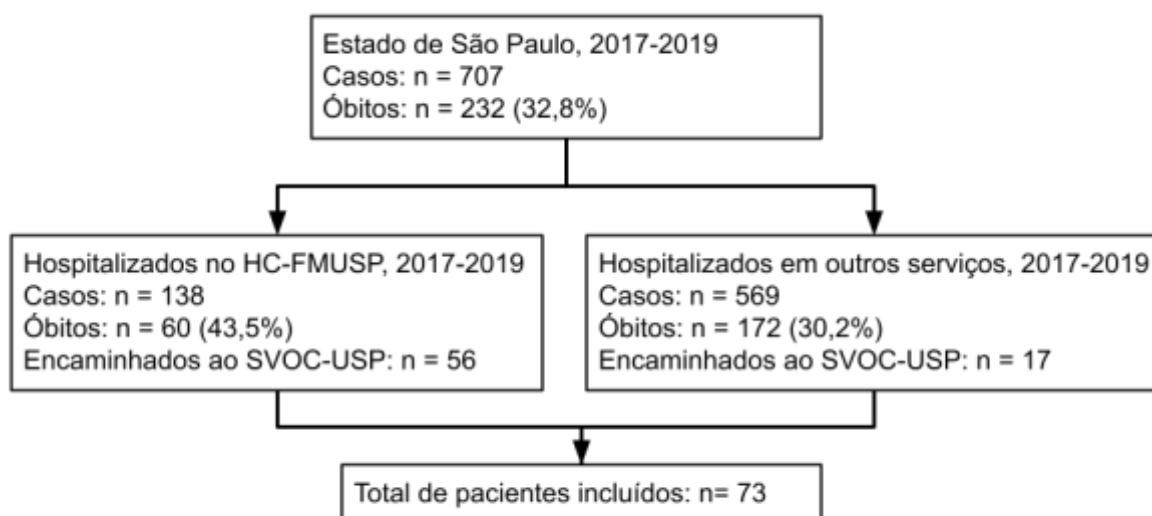
## **4-RESULTADOS**

---

#### 4.1- Características demográficas e clínicas dos pacientes incluídos

Entre 2017 e 2019, foram confirmados 707 casos de FA no Estado de São Paulo, com 232 (32,8%) óbitos. Neste mesmo período, no HC-FMUSP, foram hospitalizados 138 pacientes por diagnóstico de FA, com 60 (43,5%) mortes. Destes, 56 foram encaminhados para realização de autópsia. Outros 17 pacientes foram encaminhados ao SVOC-USP de outros serviços, totalizando 73 pacientes incluídos neste estudo. A Figura 6 ilustra o fluxograma de inclusão.

**Figura 6** - Fluxograma de inclusão de pacientes



Dados dos casos do Estado de São Paulo coletados do Centro de Vigilância Epidemiológica - CVE do Estado de São Paulo; Dados dos casos hospitalizados no HC-FMUSP Núcleo de Vigilância Epidemiológica - NUVE do HCFMUSP; Fonte: de autoria própria.

Sessenta e dois pacientes (84,9%) eram do sexo masculino, e a mediana de idade era de 48 (34-60) anos. Em relação aos antecedentes médicos, 21 (28,8%) apresentavam hipertensão arterial sistêmica, 8 (11,0%) diabetes mellitus e 5 (6,8%) cardiopatia. As cardiopatias descritas foram infarto com insuficiência cardíaca com fração de ejeção reduzida, infarto prévio sem insuficiência cardíaca, coarctação de aorta, prótese biológica em valva aórtica, e cardiopatia não especificada. Trinta e sete

(50,7%) pacientes tinham histórico de etilismo, 27 (37,0%) de tabagismo e 11 (15,1%) de uso de drogas ilícitas.

Os pacientes apresentaram um intervalo entre o início dos sintomas e o óbito mediano de 9 (7-11) dias e ficaram internados por uma mediana de 5 (3-6) dias. Todos os pacientes evoluíram com choque com necessidade do uso de vasopressores, 4 (5,5%) utilizaram inotrópicos. Dentre as intercorrências cardiovasculares, taquiarritmias supraventriculares ocorreram em 15 (20,5%), taquicardia ventricular em 1 (1,4%), bradiarritmias em 5 (6,8%) e o sinal de Faget (bradicardia relativa) em 8 (11,0%). Foram desconsideradas arritmias diagnosticadas no contexto de parada cardiorrespiratória. Todos os pacientes foram submetidos à ventilação mecânica, 62 (84,9%) foram submetidos a diálise e 4 (5,5%) foram submetidos a transplante hepático como medida terapêutica para a hepatite fulminante.

Quatorze (19,2%) pacientes receberam vacinação para FA, dentre os quais 2 foram vacinados mais de 10 dias antes do início dos sintomas. Quanto à definição do caso, 68 (93,2%) foram considerados FA silvática e 5 (6,8%) DVA-VFA. A Tabela 4 resume as principais características demográficas e clínicas dos pacientes.

**Tabela 4** – Características demográficas e clínicas de casos fatais de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Característica	Pacientes (n=73)
Sexo Masculino	62 (84,9%)
Idade	48 (34-60)
Antecedentes	
Hipertensão arterial	21 (28,8%)
Diabetes Mellitus	8 (11,0%)
Cardiopatía	5 (6,8%)
Asma / DPOC	4 (5,5%)
Hábitos	
Etilismo	37 (50,7%)
Tabagismo	27 (37,0%)
Uso de drogas ilícitas	11 (15,1%)
Intervalo (dias)	
Sintomas – internação	4 (3-6)
Sintomas – óbito	9 (7-11)
Internação - óbito	5 (3-6)
Intercorrências na internação	
Choque / uso de vasopressores	73 (100%)
Uso de inotrópicos	4 (5,5%)
Taquiarritmia supraventricular	15 (20,5%)
Taquiarritmia ventricular*	1 (1,4%)
Bradiarritmia*	5 (6,8%)
Sinal de Faget**	8 (11,0%)
Diálise	62 (84,9%)
Ventilação mecânica	73 (100%)
Dispositivos (de assistência ventricular ou estimulação artificial)	0
Transplante hepático	4 (5,5%)
Infecção secundária	56 (76,7%)
Pneumonia	54 (74,0%)
Infecção de corrente sanguínea	11 (15,1%)
Status vacinal	
Vacinação para FA	14 (19,2%)
Vacinação >10 dias antes dos sintomas	2 (2,7%)
Definição de caso	
FA silvática	68 (93,2%)
DVA-VFA	5 (6,8%)

\*não foram consideradas arritmias no contexto de parada cardiorrespiratória.  
 \*\*bradicardia relativa. DPOC: doença pulmonar obstrutiva crônica. FA: febre amarela. DVA-VFA: doença viscerotrópica aguda associada à vacina da febre amarela.

O ECG foi documentado em 42 (57,5%) pacientes no total. Dentre eles, os principais achados presentes em pelo menos um ECG do paciente foram ritmo não-sinusal (42,9%), alterações de repolarização (29,3%) e bradicardia sinusal (26,2%). O ECG foi considerado normal em somente 8 pacientes (19,0%).

O ecocardiograma foi documentado em 24 (32,9%) pacientes. Destes, somente 3 (12,5%) apresentaram fração de ejeção reduzida (<50%). Dentre eles, 2 tinham antecedente de infarto prévio à internação e o outro teve suspeita clínica de miocardite, que não foi confirmada na histopatologia, mas apresentava trombo em vasos epicárdicos com áreas de isquemia subendocárdica. Alteração segmentar e dilatação do ventrículo esquerdo foi descrita apenas nestes 2 pacientes com infarto prévio.

Dosagem de troponina T não-ultrassensível na internação foi realizada em 58 (79,5%) pacientes. Destes, 54 (93,1%) apresentaram no mínimo uma dosagem acima do valor de referência e 26 (44,8%) apresentaram ao menos uma dosagem maior que 10 vezes o valor de referência. Oito pacientes apresentaram dosagens de NT-proBNP, dos quais 4 (50%) apresentaram valores >900 pg/mL. A Tabela 5 descreve os principais achados eletrocardiográficos, ecocardiográficos e de biomarcadores séricos.

**Tabela 5** – Exames complementares de casos fatais de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Alteração	Pacientes
Eletrocardiograma	n=42
Ritmo não sinusal	18 (42,9%)
Alterações de repolarização	12 (29,3%)
Bradycardia sinusal	11 (26,2%)
Bloqueio de ramo	2 (4,8%)
Área eletricamente inativa	10 (23,8%)
Bloqueio atrioventricular 1º grau	1 (2,4%)
Normal	8 (19,0%)
Ecocardiograma	n=24
Dilatação do VE	2 (8,3%)
FE < 50%	3 (12,5%)
Alteração segmentar do VE	2 (8,3%)
Troponina T	n=58
Dosagem > LSN	54 (93,1%)
Dosagem > 10x LSN	26 (44,8%)
NT-proBNP	n=8
>900 pg/mL	4 (50%)

VE: ventrículo esquerdo; FE: fração de ejeção; LSN: limite superior da normalidade; NT-proBNP: Porção N-terminal do pró-hormônio natriurético tipo B

Para as análises de IHQ foram incluídos 9 controles, sendo 5 falecidos por sepse e 4 por doença cardiovascular. Dentre os paciente com diagnóstico de sepse, havia 3 do sexo masculino e a mediana de idade de 71 (21-85) anos; 3 pacientes faleceram por pneumonia, 1 por apendicite e 1 por isquemia com necrose intestinal. Dos controles com morte cardiovascular, todas eram do sexo feminino, a idade mediana era 75 (64-82) anos, todas apresentavam hipertensão arterial e diabetes mellitus e faleceram por edema agudo de pulmão. Para as análises de proteômica foram incluídos 12 controles, sendo 6 falecidos por sepse e 6 por doença cardiovascular. Dentre os primeiros, a mediana de idade era de 47 (22-83) anos, com 50% do sexo masculino, sendo 3 falecidos por pneumonia, 1



por apendicite aguda, 2 por peritonite secundária a abdome agudo vascular e perfurativo. Dentre os com doença cardiovascular, a mediana de idade era de 59 (51-71) anos, com 66,7% do sexo masculino, falecidos por: edema agudo pulmonar, dissecação aguda de aorta, aneurisma de aorta roto, tromboembolismo pulmonar, infarto agudo do miocárdio e arritmia por distúrbio hidreletrolítico.

#### **4.2- Achados gerais de autópsia e de macroscopia cardíaca em casos fatais de FA**

As autópsias dos pacientes com FA demonstraram, em todos os casos, as alterações hepáticas típicas da doença: hepatite com predomínio médio-zonal, observando-se hepatócitos esteatóticos e apoptóticos, com pouca resposta inflamatória associada, e com a presença de antígenos do vírus em hepatócitos degenerados e em células inflamatórias, observados por meio da técnica de imunohistoquímica. Os demais órgãos apresentaram congestão e hemorragia difusa à macroscopia, sendo necrose tubular aguda e isquemia mesentérica achados quase universais. A principal *causa mortis* foi a insuficiência hepática fulminante, causando coagulopatia grave, com hemorragia visceral, principalmente no trato gastrointestinal e pulmonar. Infecção secundária foi detectada em 76,7% dos casos, principalmente por pneumonia de padrão micro aspirativo, polimicrobiana. Houve frequente achado de necrose intestinal, com potencial translocação bacteriana.

Os corações avaliados pesavam em média 424,3 g ( $\pm 92,7$ ), sendo que 56 dos 71 pesados (78,9%) apresentavam peso acima do 350 g, considerado limite superior da normalidade neste serviço. A espessura mediana da parede livre do VE foi 1,7 cm, sendo que 42 dos 70 corações (60,0%) medidos apresentaram espessura aumentada ( $>1,5$ cm). A espessura mediana da parede do VD foi de 0,5 cm; 16 (22,9% de 70) pacientes apresentaram espessura aumentada ( $>0,5$  cm).

Em relação ao perímetro valvar dos pacientes, as medidas foram: tricúspide 11,2 cm (10,0-12,4), mitral 9,0 cm (8,0-10,0), pulmonar 7,5 cm (6,6-8,0) e aórtica 6,5 cm (6,5-7,0). Apresentavam perímetro aumentado: 12 de 46 (26,1%) da valva tricúspide ( $>12$  cm), 7 de 46 (15,2%) da valva mitral ( $>10$  cm), 2 de 54 (3,7%) da valva pulmonar ( $>8,5$  cm), e 4 de 54 (7,4%) da valva aórtica ( $>7,5$  cm).

Na macroscopia, outras alterações frequentemente observadas foram aterosclerose aórtica em 54 (74,0%) pacientes, aterosclerose coronariana em 23 (31,5%) e hemorragias no epicárdio em 23 (31,5%).

Os achados macroscópicos estão representados na Tabela 6.

**Tabela 6** – Achados macroscópicos cardíacos em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Achado	Pacientes (n=73)
Peso (g)	424,3 ( $\pm$ 92,7)
Peso aumentado (> 350 g)	56 / 71 (78,9%)
Espessura VE (cm)	1,7 (1,5-1,9)
Espessura VE aumentada (> 1,5 cm)	42 / 70 (60,0%)
Espessura VD (cm)	0,5 (0,4-0,5)
Espessura VD aumentada (> 0,5 cm)	16 / 70 (22,9%)
Perímetro valvar tricúspide (cm)	11,2 (10,0-12,4)
Perímetro valvar tricúspide aumentado (> 12 cm)	7 / 46 (15,2%)
Perímetro valvar mitral (cm)	9,0 (8,0-10,0)
Perímetro valvar mitral aumentado (> 10 cm)	7 / 46 (15,2%)
Perímetro valvar pulmonar (cm)	7,5 (6,6-8,0)
Perímetro valvar pulmonar aumentado (> 7,5 cm)	2 / 54 (3,7%)
Perímetro valvar aórtico (cm)	6,5 (6,5-7,0)
Perímetro valvar aórtico aumentado (> 7,5 cm)	4 / 54 (7,4%)
Aterosclerose aórtica	54 (74,4%)
Hemorragia do septo interventricular (face esquerda, porção basal)	32 (43,8%)
Aterosclerose coronariana	23 (31,5%)
Hemorragia epicárdica	23 (31,5%)

VE: ventrículo esquerdo; VD: ventrículo direito

#### 4.3- Achados histopatológicos

Na microscopia, os cortes de miocárdio ventricular mostraram miocardioesclerose em 68 (93,2%) pacientes. A intensidade da miocardioesclerose

variou, sendo que em 33 (45,2%) era leve, predominando no interstício perivascular, em 23 (31,5%) era moderada, com fibrose multifocal entre grupos de fibras miocárdicas, e em 12 (16,4%) era grave ou difusa. Hipertrofia de cardiomiócitos foi observada em 68 (93,2%) pacientes. Alterações endoteliais foram frequentemente encontradas, em 67 casos (91,8%), sendo 51 (69,9%) com alterações leves, em que havia tumefação das células endoteliais, 12 (16,4%) com alterações moderadas, com necrose fibrinóide de vasos, e 4 (5,5%) com alterações graves, na presença vasculite ou trombos. Também frequentemente observadas foram necrose de fibras em 50 (68,5%) pacientes, comumente necrose hialina com alteração em banda e presença de calcificações distróficas. Aterosclerose coronariana em 38 (52,1%), hemorragia intersticial em 34 (46,6%) e epicardite em 27 (37,0%) também foram usualmente observadas.

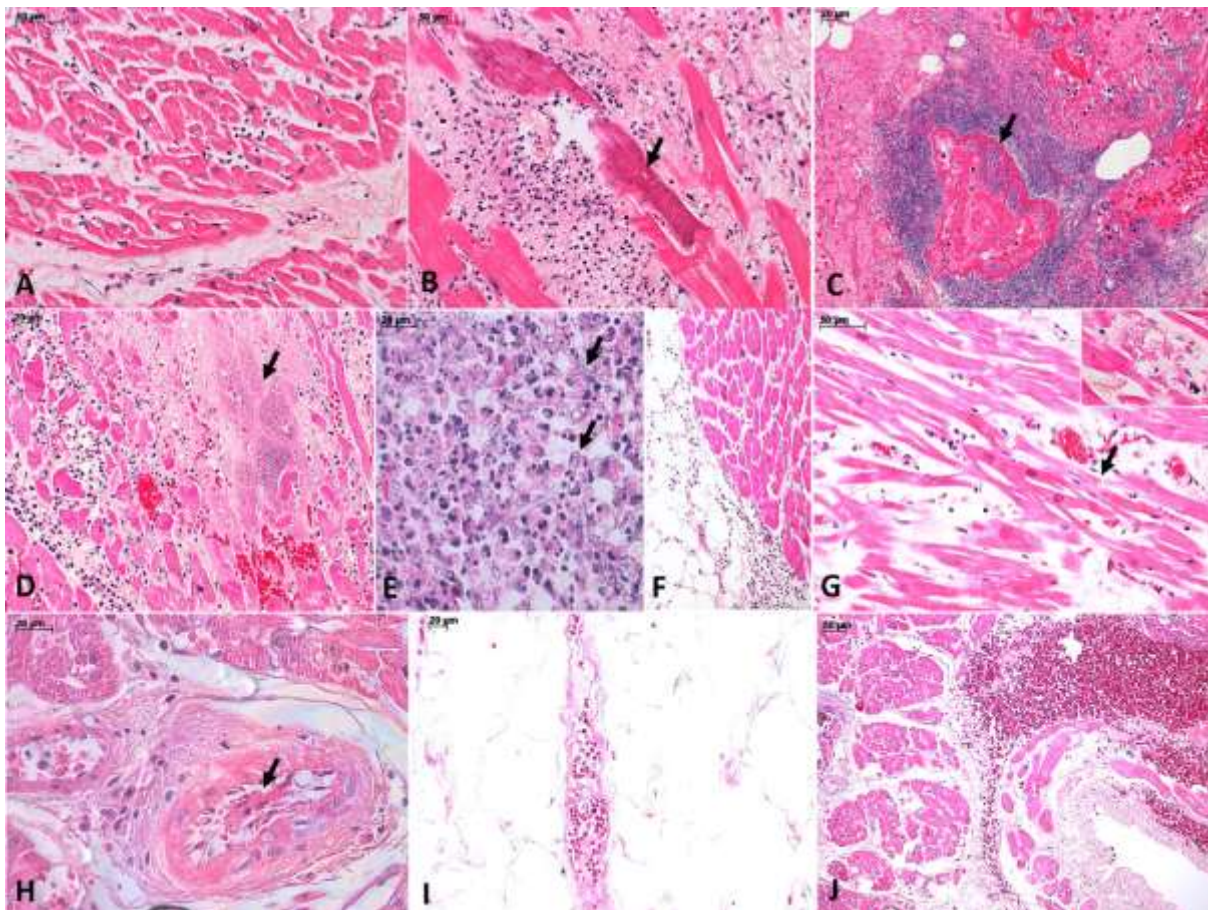
Foi encontrada miocardite em 14 (19,2%) casos. Destes, 5 tiveram outra etiologia identificada: 3 bacterianas, 1 fúngica e 1 chagásica. Nove (12,3%) foram consideradas miocardites de etiologia viral (identificado antígeno viral da FA por IHQ e RNA viral por RT-qPCR). Destas, 4 eram focais, 4 multifocais e 1 multifocal com abscesso. Foi identificado infiltrado predominante de linfócitos e macrófagos à microscopia, com presença de polimorfonucleares em alguns casos. A avaliação dos imunofenótipos celulares foi complementada com imunohistoquímica.

As alterações histopatológicas estão descritas na Tabela 7. A Figura 7 apresentam fotos dos principais achados histopatológicos.

**Tabela 7** – Alterações histopatológicas cardíacas em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Alteração	Pacientes (n=73)
Miocardioesclerose	68 (93,2%)
Leve	33 (45,2%)
Moderada	23 (34,5%)
Intensa	12 (16,4%)
Hipertrofia de cardiomiócitos	68 (93,2%)
Alterações endoteliais	67 (91,8%)
Leves	51 (69,9%)
Moderadas	12 (16,4%)
Graves	4 (5,5%)
Necrose de fibras	50 (68,5%)
Aterosclerose coronariana	38 (52,1%)
Hemorragia intersticial	34 (46,6%)
Epicardite	27 (37,0%)
Miocardite	14 (19,2%)
Secundária	5 (6,8%)
Bacteriana	3 (4,1%)
Fúngica	1 (1,4%)
Chagásica	1 (1,4%)
Viral	9 (13,2%)
Focal	4 (5,5%)
Multifocal	4 (5,5%)
Abscesso	1 (1,4%)

**Figura 7** – Aspectos microscópicos da patologia cardíaca em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil



**A.** Infiltrado inflamatório mononuclear no interstício do miocárdio, com edema associado. **B.** Miocardite por infiltrado inflamatório misto, com agressão franca às fibras cardíacas, algumas com calcificação distrófica (seta). **C.** Miocardite secundária por bacilos Gram-negativos, com necrose vascular hemorrágica (seta). **D.** Miocardite secundária por colônias de cocos Gram-positivos (seta). **E.** Miocardite secundária por hifomicetos com morfologia compatível com *Aspergillus* spp (setas). **F.** Epicardite por infiltrado inflamatório misto. **G.** Necrose hialina, em banda de contração de fibras cardíacas (seta), com miólise de fibras (*inset*), infiltrado inflamatório mononuclear e edema intersticial. **H.** Vaso arterial do miocárdio com tumefação de células endoteliais, fibrina na luz do vaso (seta), infiltrado inflamatório mononuclear perivascular e edema. **I.** Vênula epicárdica com necrose fibrinóide do endotélio. **J.** Hemorragia no subendocárdio e miocárdio. *Hematoxilina-Eosina*. *Magnificação*: C, F, J:100x; A, B, D, G e I: 200x; E e H: 400x. Fonte: de autoria própria

#### 4.4- Imunohistoquímica

Vinte e quatro casos de FA foram enviados para análise de IHQ com marcadores de imunofenótipo celular (CD68, CD45, CD57, CD4, CD8), bem como 9

controles, com diagnósticos de sepse bacteriana e morte cardiovascular. Nos casos de FA avaliados, a mediana da contagem de células por campo demonstrou: 14,8 CD68+; 2,8 CD45+; 0,3 CD57+; 1,4 CD4+; e 2,1 CD8+. Na comparação entre os grupos, houve diferença estatística para as contagens de células CD68+ e CD45+. Para CD45, o grupo FA apresentou maior número de células marcadas que os grupos sepse e cardiovascular; em relação ao CD68, houve significância estatística limítrofe ( $p=0.056$ ) no teste post hoc na comparação entre os grupos FA e cardiovascular. Dentro do grupo FA, houve diferença estatística na contagem de CD68, maior no grupo com miocardite; nos demais marcadores houve uma tendência de maior contagem de células no grupo com miocardite, mas sem atingir significância estatística.

A análise qualitativa revelou predomínio de infiltrado linfomonocítico, especialmente macrófagos. Em alguns casos de miocardite, havia infiltrado misto com quantidade relevante de neutrófilos. Quanto à localização, os leucócitos predominaram em regiões do interstício perivascular, seguido pelo perimísio e, mais raramente, endomísio miocárdico.

O antígeno da FA foi avaliado de forma semiquantitativa e classificado em negativo, + ou 2+. Todos os casos apresentaram antígeno positivo, sendo que em 5 (20,8%) houve maior positividade. O antígeno localizou-se majoritariamente no citoplasma de células inflamatórias, especialmente macrófagos, e de células endoteliais. Não foi observada marcação de antígeno no interior de cardiomiócitos.

Angiopietina-2 também foi avaliada de forma semiquantitativa em 19 pacientes e classificada em negativo, +, 2+ ou 3+. Casos de FA mostraram intensa marcação no endotélio vascular; 10 (52,6%) foram classificados como 3+; 9 (47,4%) como 2+, and 1 (5,3%) como +. Houve diferença estatisticamente significativa na comparação com os grupos controles ( $p=0.007$ ), com maior marcação no grupo FA.

A Tabela 8 descreve os achados de IHQ. A Figura 8 mostra imagens dos achados de IHQ. As comparações estão representadas na Figura 9.

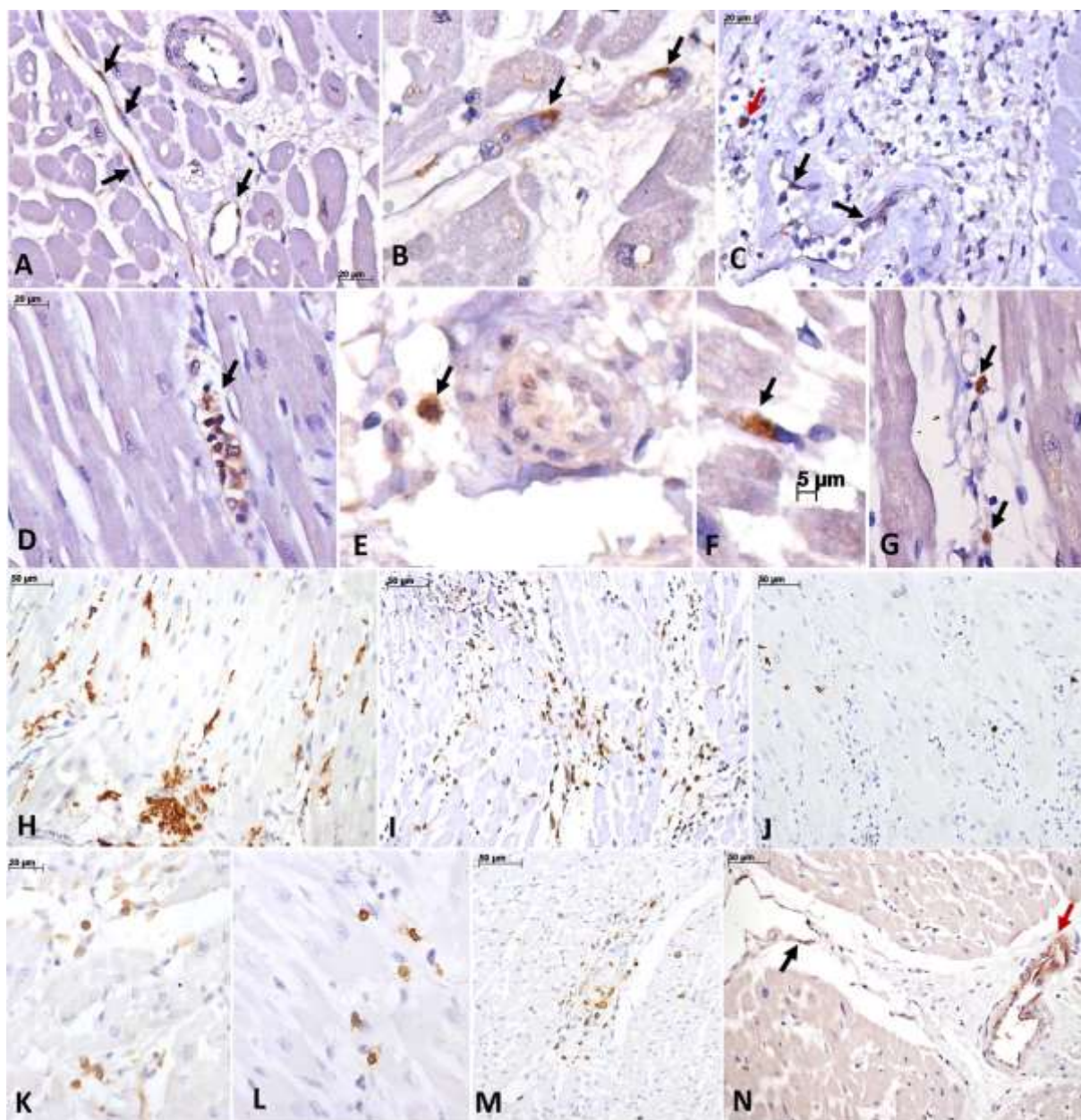
**Tabela 8** - Contagem de células marcadas por reação imunohistoquímica em tecido miocárdico de autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Achados	Febre Amarela (n=24)
Células CD68+	14,3 (10,6-19,5)
Células CD45+	2,8 (2,3-5,4)
Células CD57+	0,3 (0,1-0,5)
Células CD4+	1,4 (0,5-1,5)
Células CD8+	2,1 (0,4-2,3)
Antígeno FA positivo	24 (100%)
Positividade 1+	19 (79,2%)
Positividade 2+	5 (20,8%)
Angiopoiatina 2	n = 19
Positividade 1+	1 (5,3%)
Positividade 2+	9 (47,4%)
Positividade 3+	10 (52,6%)

Mediana (P25-P75); contagem de média de células por campo em 30 campos; FA: febre amarela



**Figura 8** - Aspectos histológicos e de imunohistoquímica no tecido cardíaco examinado em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

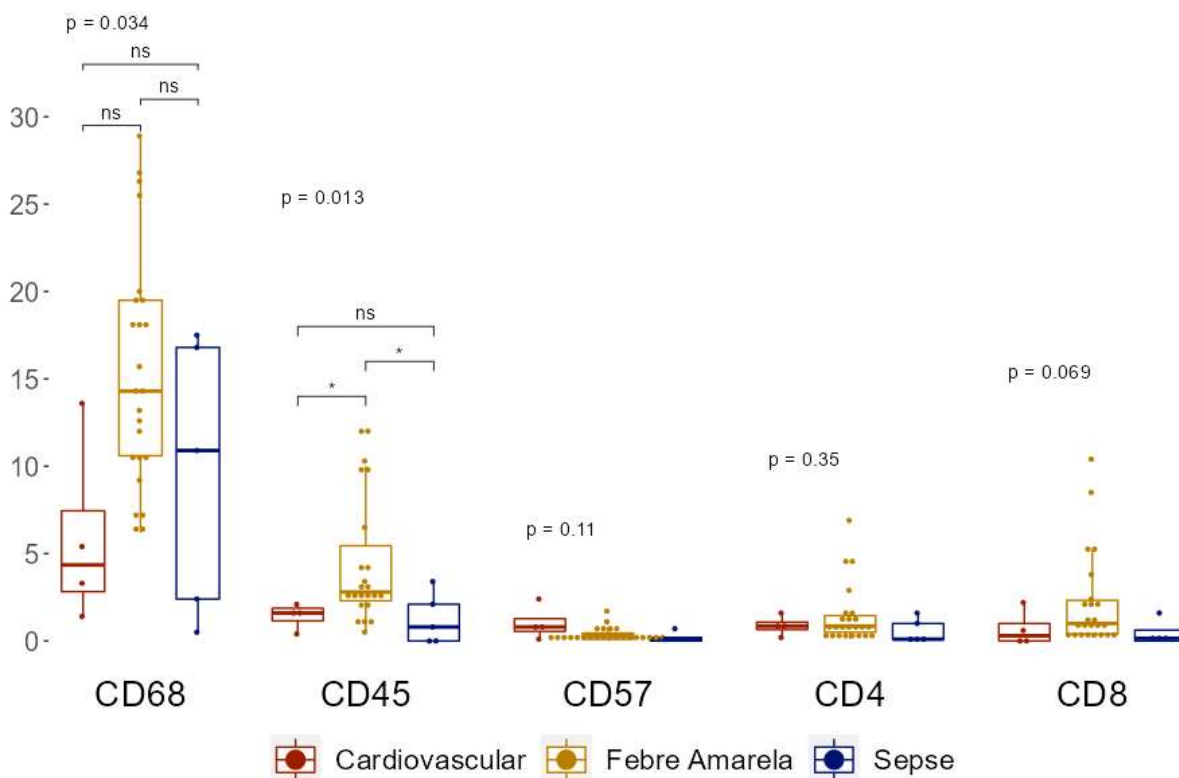


**A-G.** Imunomarcção de antígeno do vírus da febre amarela no citoplasma de células endoteliais de vasos do miocárdio (A e B, setas); células inflamatórias (c, seta vermelha) e em células endoteliais (C, seta preta) em foco de miocardite mista, atribuída à febre amarela; em leucócitos circulantes, em caso com RT-PCR positiva no sangue no dia do óbito (D, seta); em células inflamatórias perivasculares no epicárdio (E, seta); em células entre as fibras cardíacas (F e G, setas). **H-M.** Imunofenótipo de células inflamatórias do miocárdio: células CD68+ (H); células CD45+ (I); células NK (J); células T-CD4+ (K); células T-CD8+ em caso de febre amarela silvática (L) e células T-CD8+ em caso de doença viscerotrópica aguda associada à vacina da febre amarela, com miocardite (M). **N.** Aumento da expressão de angiopoietina-2 em vasos venosos (seta preta) e arteriais (seta vermelha) em casos de febre



amarela. *Peroxidase*. *Magnificação*: H, I, J, M, N: 100x; A, C, D, G, K, L: 200x; B, E e F: 400x. Fonte: de autoria própria.

**Figura 9** – Análise comparativa da contagem de células marcadas por imunohistoquímica conforme diagnóstico, em tecido cardíaco de autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil



Contagem média de células por campo em 30 campos de grande aumento após reação de imunohistoquímica comparando pacientes falecidos por febre amarela (n=24) a controles falecidos por sepse (n=5) e doença cardiovascular (n=4). Para as comparações, foi utilizado teste de Kruskal-Wallis, com valor de p descrito. Para  $p < 0,05$ , realizado teste post-hoc de Dunn com correção de Benjamini-Hochberg para comparações múltiplas. \*  $p < 0,05$ ; ns: não significativo. Fonte: de autoria própria.

#### 4.5- Sistema de condução cardíaco

Foi representado histologicamente o sistema de condução cardíaco em 8 casos de febre amarela. Os achados mais prevalentes foram edema intersticial; focos de hemorragia intersticial; discreto infiltrado inflamatório perivascular e intersticial, composto predominantemente por macrófagos ativados (CD68+) e raros leucócitos (CD45+) em diversos segmentos do sistema de condução (nó sinoatrial, nó compacto,

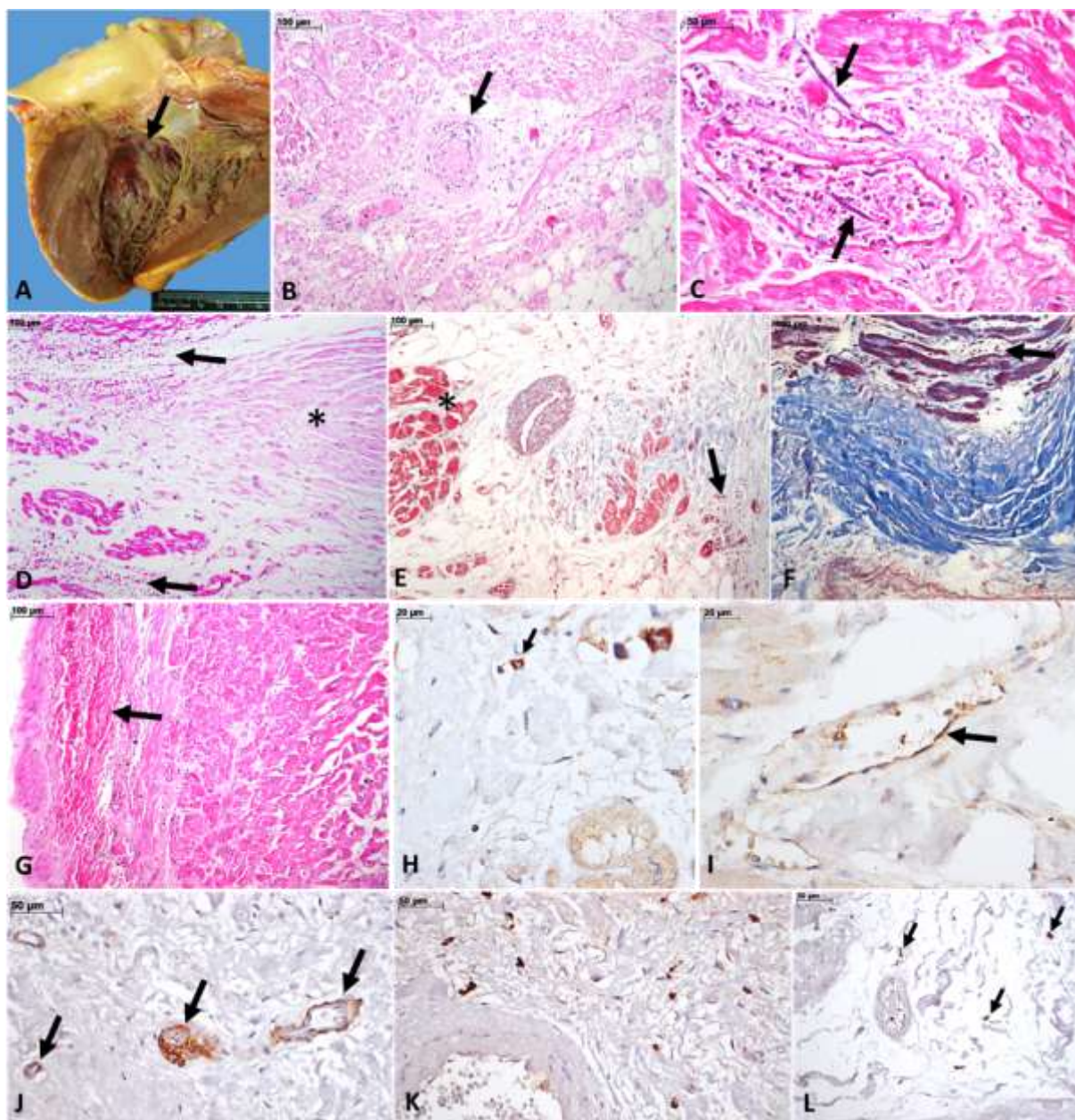
feixe de His, ramo esquerdo), em todos os casos. Outros achados observados foram: fibrose do NSA em 2 pacientes; alteração fibrinóide da artéria do NSA em 2 casos; necrose de fibras do sistema de condução em 1 paciente; trombo micótico por hifomiceto, com morfologia compatível com *Aspergillus* spp. em 1 caso. Em 4 casos, foi detectado antígeno do vírus da febre amarela no citoplasma de células endoteliais de pequenos vasos e/ou de células inflamatórias, próximos a algum segmento do sistema de condução, de forma discreta. Os vasos próximos ao sistema de condução apresentaram expressão aumentada de angiopoietina-2. A Tabela 9 descreve os achados do sistema de condução cardíaco e a Figura 10 demonstra as alterações.

**Tabela 9** - Alterações do sistema de condução cardíaco em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Alteração	Pacientes (n=8)
Edema intersticial	8 (100%)
Hemorragia intersticial, focal	8 (100%)
Infiltrado inflamatório discreto	8 (100%)
Presença de antígeno do vírus da FA	4 (50%)
Necrose fibrinóide da artéria do NSA	2 (25%)
Fibrose do NSA	2 (25%)
Trombo micótico por hifomiceto	1 (12,5%)
Necrose de fibras do sistema de condução	1 (12,5%)

FA: febre amarela. NSA: Nó sinoatrial.

**Figura 10** – Aspectos patológicos do sistema de condução cardíaco em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil



**A.** Macroscopia do coração demonstrando achado comum nos casos de febre amarela: hemorragia subendocárdica na face lateral esquerda basal do septo interventricular, em área topográfica do sistema de condução (ramo esquerdo). **B.** Artéria nutridora do nó sinoatrial (seta) com tumefação endotelial, agregados de fibrina no lúmen vascular, edema da camada média da parede do vaso e edema intersticial perivascular. **C.** Artéria próxima ao nó sinoatrial exibindo trombo micótico por hifomiceto (setas), em caso de infecção secundária por *Aspergillus* spp. **D.** Edema e hemorragia intersticial (setas) em torno do nó compacto (asterisco). **E.** Edema e hemorragia intersticial (seta) em torno do feixe de His (asterisco). **F.** Edema e hemorragia intersticial (seta) em torno da porção proximal do ramo esquerdo. **G.** Edema e hemorragia intersticial (seta) em torno da porção distal do ramo esquerdo. **H-I.** Imunomarcação de antígeno do vírus da febre amarela no citoplasma de macrófago intersticial próximo ao nó sinoatrial (h, seta e inset) e em células endoteliais de alguns vasos no miocárdio

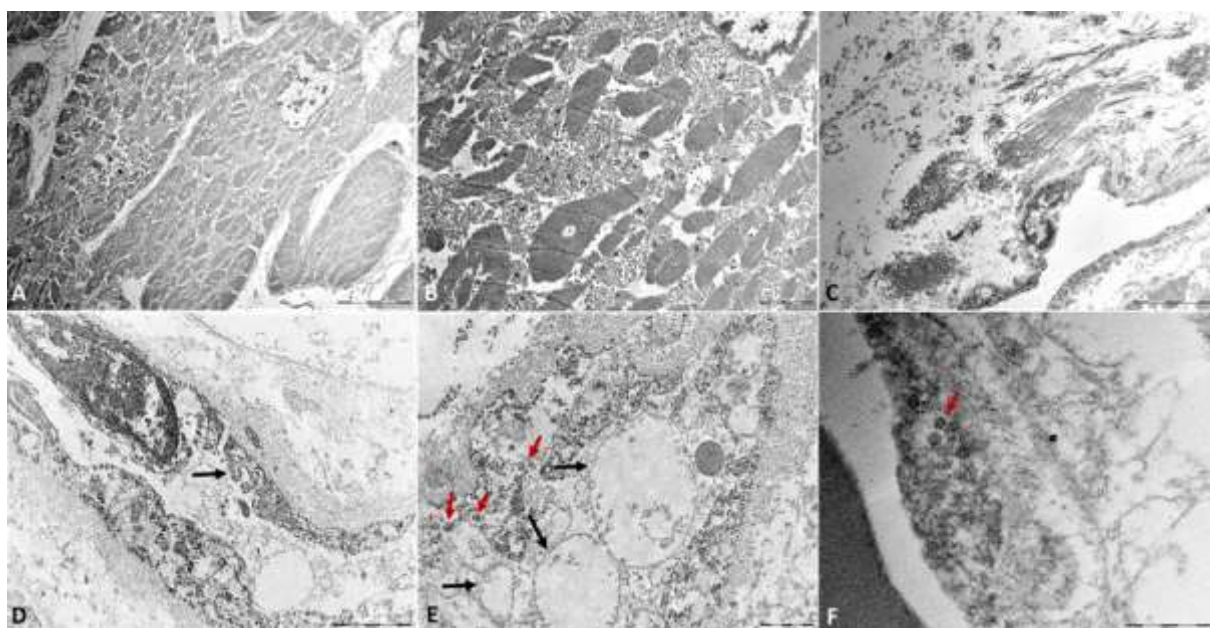


(i, seta), próximo ao feixe de His e ramo esquerdo. **J.** Aumento da expressão de angiopoetina-2 em vasos próximos ao nó sinoatrial. **K.** Infiltrado inflamatório por macrófagos ativados (CD68+) em torno da artéria nutridora do nó sinoatrial. **L.** Imunomarcação para CD45 em linfócitos intersticiais (setas), próximos ao feixe de His. *Hematoxilina-Eosina*: B, C, D, G; *Tricrômio de Masson*: E, F; *Peroxidase*: H-L. *Magnificação*: B, D, E, F, G: 100x; C, J, K, L: 200x; H, I: 400x. Fonte: de autoria própria.

#### 4.6- Microscopia eletrônica

Três casos foram avaliados por microscopia eletrônica de transmissão. Em todos eles, foi possível identificar alterações nas células endoteliais, tais como tumefação do citoplasma, com emissão de pseudópodes e degeneração vesicular do retículo endoplasmático. Em 1 dos casos, foram identificadas partículas arredondadas e eletrodensas, semelhantes a vírions de Flavivírus, agrupadas em 2-4 partículas, medindo entre 80-150 nm, no interior das vesículas de retículo endoplasmático. Outros achados são: cardiomiócitos exibindo desarranjo de sarcômeros, mitocondriose, ruptura de cristas mitocondriais e edema no interstício perivascular. A Figura 11 apresenta achados de ultraestrutura dos corações.

**Figura 11** - Aspectos ultraestruturais cardíacos em autópsias de casos de febre amarela durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil



**A.** Desarranjo de sarcômeros e mitocôndrias na fibra cardíaca. **B.** Mitocondriose e ruptura de cristas mitocondriais. **C.** Fibras colágenas dissociadas, pelo edema perivascular. **D.** Células endoteliais do miocárdio com citoplasma tumefeito, exibindo pseudópodes (seta). **E.**

Citoplasma de células endoteliais exibindo degeneração vesicular do retículo endoplasmático liso (setas pretas), com algumas vesículas exibindo partículas redondas eletrodensas, medindo de 110-150nm (setas vermelhas). F. Citoplasma de célula endotelial exibindo vesícula de retículo endoplasmático, contendo duas partículas eletrodensas medindo entre 80-90 nm. Fonte: de autoria própria.

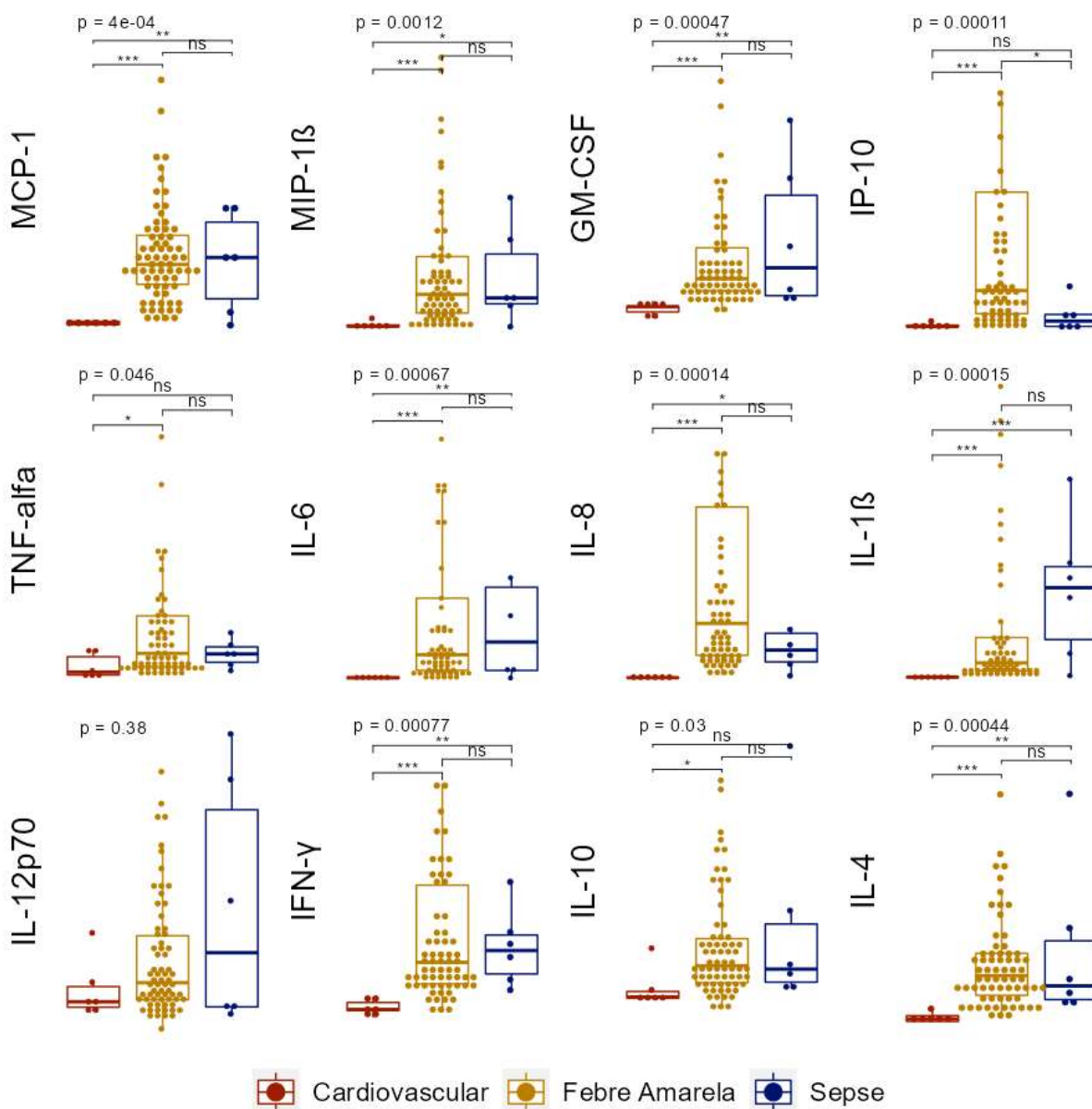
#### **4.7- Detecção de RNA viral**

Fragmentos de coração de 69 pacientes foram avaliados por RT-qPCR para detecção e quantificação de RNA do vírus da FA. Em 66 (95,7%), o resultado foi positivo, com uma média de 26,5 ( $\pm 4,1$ ) ciclos para detecção.

#### **4.8- Avaliação proteômica**

Os imunoenaios multiplex para citocinas inflamatórias e proteínas de importância na função endotelial, hemostasia e trombose foram realizados em 69 casos e 12 controles, dos quais 6 falecidos por sepse e 6 por causas cardiovasculares. Na análise de citocinas, houve maior concentração no grupo com FA comparado ao grupo com morte cardiovascular nas dosagens de GM-CSF, IFN- $\gamma$ , IL-10, IL-1 $\beta$ , IL-4, IL-6, IL-8, IP-10, MCP-1, MIP-1  $\beta$  e TNF- $\alpha$ . Na comparação entre FA e sepse houve diferença estatisticamente significativa somente na dosagem de IP-10, maior no grupo FA. As comparações estão representadas na Figura 12.

**Figura 12** – Comparação entre a concentração de citocinas inflamatórias em tecido cardíaco de pacientes com febre amarela e de controles com sepse e morte cardiovascular

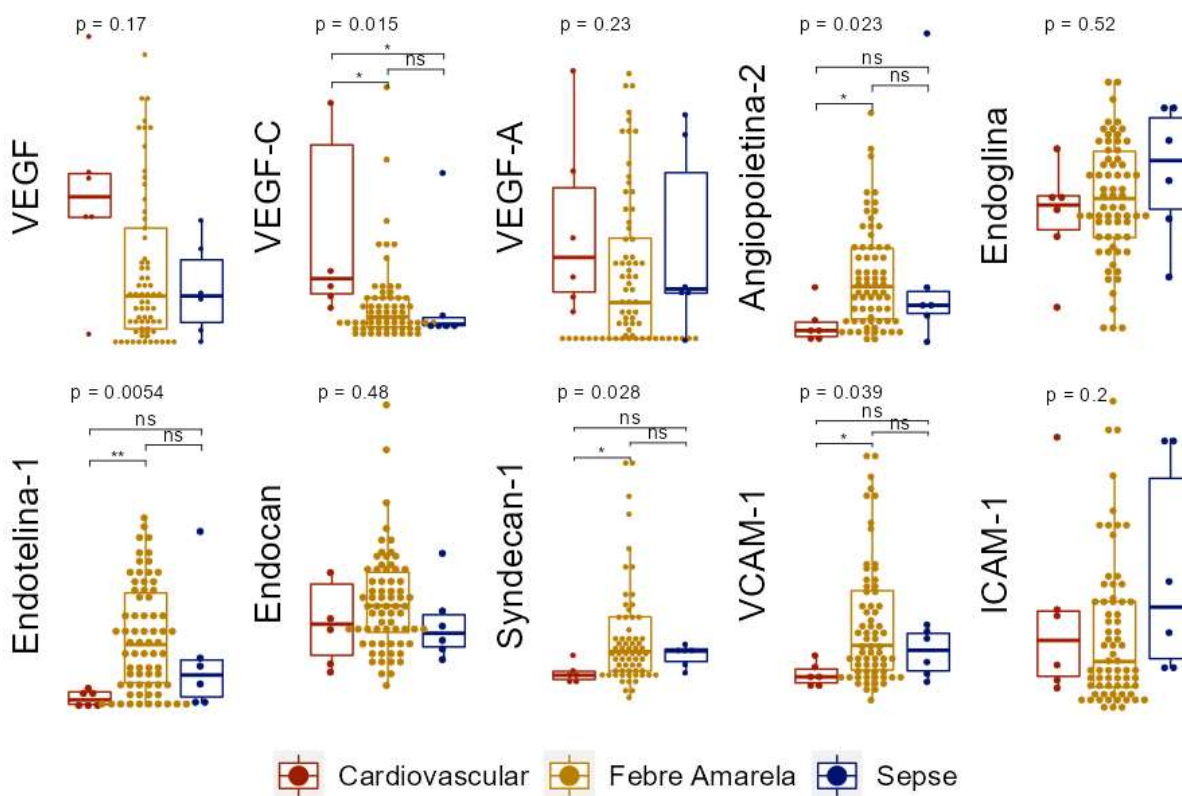


Dosagem de citocinas realizadas através de imunoenensaio multiplex em fragmentos de tecido miocárdico congelado, obtido de autópsia. TNF: fator de necrose tumoral; IFN: interferon, IL: interleucina; MCP-1: *monocyte chemoattractant protein 1*; MIP1- $\beta$ : *macrophage inflammatory protein 1 - beta*; IP-10: *Interferon gamma-induced protein 10*; GM-CSF: fator estimulador de colônias de granulócitos e macrófagos. Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis para as comparações entre os 3 grupos. Quando havia significância estatística, foi utilizado teste *post-hoc* de Dunn com correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas comparações. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; \*\*\*  $p < 0,001$ ; \*\*\*\*  $p < 0,0001$ ; ns: não significativo. Fonte: de autoria própria.

Na comparação, dentro do grupo FA, entre pacientes sem miocardite e pacientes com miocardite viral, não houve diferença estatística na concentração de nenhuma das citocinas.

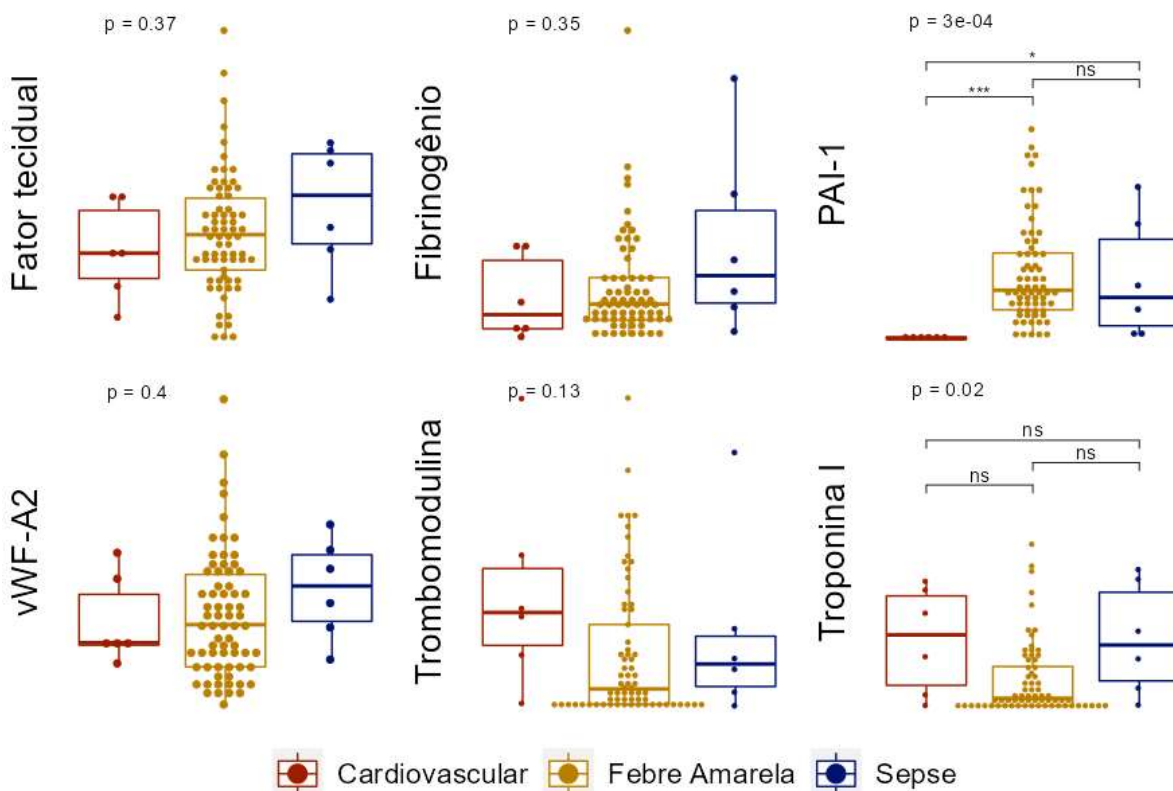
Houve diferença estatisticamente significativa entre casos de FA e morte cardiovascular nas dosagens de VEGF-C, angiopoietina-2, endotelina-1, syndecan-1, VCAM-1, PAI-1. O VEGF-C apresentou valores significativamente maiores no grupo cardiovascular e as demais proteínas tiveram níveis significativamente maiores no grupo FA. Na comparação entre FA e sepse não houve diferença estatisticamente significativa. As comparações estão representadas nas Figuras 13 e 14.

**Figura 13** – Comparação entre a concentração de proteínas relacionadas à função endotelial em tecido cardíaco de pacientes com febre amarela e de controles com sepse e morte cardiovascular



Dosagem de proteínas realizadas através de imunoenensaio multiplex em fragmentos de tecido miocárdico congelado, obtido de autópsia. VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; VCAM-1: *vascular cell adhesion molecule 1*; ICAM-1: *Intercellular adhesion molecule 1*. Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis para as comparações entre os 3 grupos. Quando havia significância estatística, foi utilizado teste *post-hoc* de Dunn com correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas comparações. \*  $p < 0,05$ ; \*\*  $p < 0,01$ ; ns: não significativo. Fonte: de autoria própria

**Figura 14** - Comparação entre a concentração de proteínas relacionadas a trombose e hemostasia em tecido cardíaco de pacientes com febre amarela e de controles com sepse e morte cardiovascular



Dosagem de citocina realizadas através de imunoensaio multiplex em fragmentos de tecido miocárdico congelado, obtido de autópsia. PAI-1: inibidor de ativação de plasminogênio; vWF-A2: fator de von Willebrand A2. Foi utilizado teste de Kruskal-Wallis para as comparações entre os 3 grupos. Quando havia significância estatística, foi utilizado teste *post-hoc* de Dunn com correção de Benjamini-Hochberg para múltiplas comparações. \* p<0,05; \*\* p<0,01; ns: não significativo. Fonte: de autoria própria

Na comparação, dentro do grupo FA, entre pacientes sem miocardite e pacientes com miocardite viral, houve diferença estatística na concentração de PAI-1, menor no grupo com miocardite.



#### 4.9- Subanálise do grupo com DVA-VFA

Cinco pacientes (6,8%) foram diagnosticados com DVA-VFA, com idades de 6, 32, 37, 49 e 66 anos, sendo 3 do sexo masculino. Todos os pacientes receberam a vacina até 5 dias antes do início dos sintomas. Três pacientes apresentaram peso do coração elevado, e 2 aumento da espessura do VE. À microscopia, foi observado miocardioesclerose e hipertrofia de cardiomiócitos em 4 casos, hemorragia em 2 casos e necrose de fibras em todos os casos. Miocardite foi detectada em 4 casos, 2 focais e 2 multifocais, com características linfocíticas. Observou-se alterações endoteliais em todos os casos, com necrose fibrinóide de vasos em 2 e trombo em coronárias em um. A contagem de células inflamatórias por campo através de IHQ revelou mediana de 18,3 (15,4 - 26,2) céls CD68+; 6,8 (2,9 - 11,4) céls CD45+; 0,3 (0,1 - 1,2) céls CD57+; 4,5 (0,4 - 5,8) céls CD4+; 2,4 (1,5 - 9,4) céls CD8+. Comparando com o grupo FA silvática, houve maior contagem média de CD8 por campo (2,4 vs 0,8;  $p=0,03$ ). Na análise proteômica, foi observada maior concentração de IFN- $\gamma$  no grupo com DVA-VFA em relação ao grupo com FA silvática. A Tabela 10 descreve os casos com DVA-VFA.

**Tabela 10** - Características dos casos de doença viscerotrópica aguda associada à vacina da febre amarela submetidos a autópsia durante a epidemia 2017-2019, São Paulo, Brasil

Nº Caso	Idade	Sexo	Intervalo vacina - sintomas	Antecedentes	Intercorrências cardiológicas	Histopatologia
57	49	M	5	Tabagismo, filariose	-	Miocardiosclerose, hipertrofia, miocardite focal linfocítica, necrose de fibras, tumefação de céls endoteliais
64	32	M	2	HAS, DRC dialítica	Endocardite	Miocardiosclerose difusa, hipertrofia, miocardite multifocal linfocítica, necrose de fibras, necrose fibrinóide de vasos, infarto subagudo subendocárdico
65	37	M	3	Etilismo, epilepsia	TSV	Miocardiosclerose difusa, hipertrofia, necrose de fibras, necrose fibrinóide de vasos
66	66	F	4	HAS, neoplasia de mama curada	-	Miocardiosclerose, hipertrofia, miocardite focal linfocítica, necrose de fibras, tumefação de céls endoteliais, hemorragia intersticial
73	6	F	1	Hígida	Uso de inotrópico	Miocardite multifocal linfocítica, trombose coronariana aguda, hemorragia intersticial

M: masculino; F: feminino; DRC: doença renal crônica; TSV: taquiarritmia supraventricular

## **5-DISSCUSSÃO**

---

### **5.1- Aspectos gerais da lesão miocárdica associada à febre amarela**

O presente estudo descreveu a patologia cardíaca de 73 pacientes que faleceram por FA durante a epidemia de 2017-2019, na Região Metropolitana de São Paulo, e demonstrou alta prevalência de alterações. A lesão miocárdica associada à febre amarela manifestou-se clinicamente com bradicardias, taquiarritmias, elevação de troponina e choque, enquanto a histopatologia demonstrou necrose de fibras, hemorragias, hipertrofia, miocardioesclerose, infiltrado inflamatório com predomínio de macrófagos e alterações endoteliais. Também foi observada miocardite linfocítica viral em uma menor proporção de casos. Foi demonstrada a presença de antígeno viral, através de IHQ, RNA viral, através de RT-qPCR, e partículas virais, por microscopia eletrônica, no tecido miocárdico dos casos avaliados. No seu perfil proteômico, o tecido cardíaco mostrou elevada concentração de citocinas inflamatórias e de proteínas associadas a lesão endotelial.

### **5.2- A FA é uma doença sistêmica grave e os pacientes apresentam lesão miocárdica e endotelial frequente**

A FA é uma doença sistêmica, assim como outras arboviroses, ainda que o principal órgão acometido seja o fígado. Esse aspecto foi demonstrado em estudos anteriores, através da descrição de alterações clínicas e histopatológicas em diversos tecidos, bem como pela caracterização de antígeno e RNA viral em múltiplos órgãos.<sup>19,21,22,28,29,42,44</sup> O conjunto dos achados deste estudo detalha o acometimento do coração pela doença.

No aspecto clínico, todos os pacientes evoluíram com quadro de choque distributivo, com necessidade de uso de vasopressores, refletindo falência hemodinâmica associada ao quadro inflamatório. Alguns receberam inotrópicos, medicação que sugere a identificação de um componente cardiogênico no choque pelo médico assistente. O ecocardiograma formal foi realizado em poucos pacientes, possivelmente reflexo da alta disponibilidade de ultrassom *point-of-care* realizado por médicos intensivistas à beira-leito; em poucos casos foi mostrada formalmente disfunção ventricular. Muitos pacientes apresentaram taquiarritmias, particularmente supraventriculares, e a avaliação eletrocardiográfica mostrou alta frequência de ritmo

não-sinusal, maior que o demonstrado por Paixão e cols., talvez reforçando a maior gravidade dos pacientes incluídos neste trabalho.<sup>48</sup> Diversos pacientes apresentaram bradicardia sinusal no ECG, bradiarritmias clinicamente detectadas ou sinal de Faget, corroborando o que fora demonstrado em modelos animais e em coortes de pacientes com FA.<sup>48,49,51</sup> A troponina foi dosada na ampla maioria dos casos, com elevada proporção de pacientes com pelo menos uma medida acima do valor de referência. Este achado é inédito na literatura. A elevação da troponina sérica reflete injúria miocárdica, como demonstrado em diversas doenças infecciosas, como a COVID-19, onde está associada a um pior prognóstico.<sup>89</sup> No entanto, a elevada proporção de pacientes com insuficiência renal aguda com necessidade de diálise (84,9%) pode ser um fator de confusão na avaliação de troponina.

A avaliação patológica também mostrou alta prevalência de alterações. Hipertrofia de cardiomiócitos foi frequentemente observada na microscopia, corroborando a alta proporção de casos com peso do coração e espessura das paredes elevadas na macroscopia. Miocardioesclerose também foi observada na ampla maioria dos pacientes. Tais achados costumam estar mais associados a cardiopatias crônicas, mas os pacientes incluídos eram em média jovens, com poucas comorbidades cardiovasculares. Deste modo, é possível que haja contribuição do quadro agudo para estes achados. Autópsias de pacientes falecidos por sepse já mostraram hipertrofia e fibrose intersticial no coração.<sup>90</sup> Miocardite viral também foi descrita em alguns pacientes deste estudo, a maioria com padrão linfomononuclear. Necrose de fibras foi um achado comum, geralmente com padrão hialino e em banda, com calcificações distróficas em alguns casos. Também encontramos frequentemente hemorragia intersticial, lesão endotelial e edema intersticial, corroborando a hipótese de que a FA, como a dengue, causa dano endotelial importante.

Foi demonstrada a presença de componentes virais no tecido miocárdico. A presença de antígeno viral observada pela técnica imunohistoquímica foi descrita pela primeira vez por de Brito e cols., e foi observada novamente nos nossos casos.<sup>19</sup> A distribuição espacial dos antígenos predominou no interior de células inflamatórias e, em raros casos, no interior de células endoteliais. O RT-qPCR também foi capaz de identificar RNA viral na quase totalidade dos casos, corroborando o que fora encontrado anteriormente.<sup>21,22,24</sup>

O conjunto dos achados clínicos-patológicos mostrados reforça a hipótese de que o sistema cardiovascular é frequentemente lesado em casos graves de FA, com injúria miocárdica, arritmias, choque e miocardite, tendo substrato histopatológico que a justifique e presença viral no tecido miocárdico.

### **5.3- A inflamação local e sistêmica é importante mecanismo de lesão miocárdica, com alta concentração de citocinas, como IP-10, e miocardite aguda viral**

A inflamação sistêmica já foi demonstrada como um importante mecanismo de injúria miocárdica em doenças infecciosas, com associação entre elevadas dosagens de citocinas, infiltrado de células inflamatórias e piora da função cardíaca na sepse.<sup>61</sup> Neste estudo, mostramos que o perfil imunohistoquímico e proteômico do coração de paciente falecidos por FA, no tocante a inflamação, era semelhante ao de pacientes falecidos por sepse bacteriana, e diferente de pacientes com morte cardiovascular.

A análise imunohistoquímica revelou elevada contagem de células inflamatórias no tecido miocárdio de pacientes com FA, em especial de macrófagos. A infiltração de macrófagos já havia sido descrita como um fator associado à lesão cardíaca na sepse, e parece ter contribuição na patogenia da lesão miocárdica da FA.<sup>63</sup>

Foi demonstrada maior concentração de quase todas as citocinas inflamatórias nos casos de FA em relação aos controles cardiovasculares. Já havia sido previamente descrito o aumento da expressão no fígado de mediadores inflamatórios em pacientes com FA.<sup>91</sup> Neste trabalho, citocinas pró-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , IL-1 beta, IL-6, IL-8, IL-12), quimiocinas (IP-10, MCP-1, MIP-1 $\beta$ ), fator estimulador (GM-CSF) e até citocinas com perfil anti inflamatório, como IL-4 e IL-10, apresentaram níveis aumentados em relação aos controles cardiovasculares. A elevada concentração destes biomarcadores *in situ* sugere um microambiente extremamente inflamatório, possivelmente decorrente de processo sistêmico de liberação maciça de citocinas.

Na comparação com os controles falecidos por sepse bacteriana, houve diferença somente na concentração tecidual de IP-10, maior no grupo FA. A IP-10 ,

também denominada CXCL10, é uma quimiocina que atua no recrutamento de linfócitos, monócitos e células NK. Estudos anteriores demonstraram que níveis de IP-10 estão elevados em pacientes com dengue, COVID-19, Zika, sendo inclusive considerado um marcador de gravidade.<sup>92-96</sup> IP-10 também inibiu replicação viral em camundongos com miocardite por coxsackievirus B3 através do recrutamento de células NK.<sup>97</sup> Apesar de sua importância na resposta imune, postula-se que níveis excessivos poderiam contribuir para a manutenção da tempestade de citocinas observada na COVID-19.<sup>98</sup> É possível que, assim como em outras doenças virais, o IP-10 seja um marcador prognóstico importante, e a elevação de seus níveis se correlacione com lesões orgânicas, como a injúria miocárdica.

Em 19,2% dos casos, foi encontrada miocardite na avaliação da histopatologia dos pacientes falecidos por FA. Define-se miocardite como uma afecção inflamatória do coração, em que haja infiltrado inflamatório associado a necrose miocárdica. Em 5 casos, foi encontrado outro agente etiológico que justificava o quadro. Em 9 casos, a etiologia foi considerada viral pela FA. As etiologias infecciosas são a principal causa de miocardite no mundo, sendo, dentre estas, as virais as mais frequentes.<sup>99</sup>

Nesses pacientes foi realizada avaliação por imunohistoquímica para avaliação do perfil de imunofenótipo celular associado à miocardite, que mostrou predomínio de infiltrado linfomonocítico, em especial macrófagos. Na maioria dos casos, o infiltrado era discreto, em pequenos focos.

A avaliação por imunohistoquímica do antígeno viral nos casos de miocardite não mostrou positividade no interior dos cardiomiócitos, diferentemente do que havia sido mostrado anteriormente.<sup>19</sup> O local de predominância da marcação foi o citoplasma de células inflamatórias e, em raros casos, o citoplasma de células endoteliais. Esses achados sugerem que o mecanismo de lesão não é a invasão direta do cardiomiócito, como em alguns enterovírus, mas potencialmente um fenômeno imuno-mediado.

Não houve suspeita clínica de miocardite em nenhum dos casos com achado histopatológico positivo. Isso pode ser explicado por múltiplos fatores. O primeiro é que o diagnóstico de miocardite é difícil; o diagnóstico definitivo requer exame invasivo com biópsia.<sup>99</sup> O exame de imagem que mais se aproxima da acurácia da avaliação histopatológica é a ressonância nuclear magnética do coração, que está

contraindicada em pacientes com instabilidade hemodinâmica. Outro motivo é a grande variabilidade de apresentação clínica e gravidade da doença, variando desde formas oligossintomáticas até formas fulminantes com disfunção ventricular importante e óbito. Não é possível estabelecer a relevância clínica das miocardites encontradas, ainda mais considerando que todos os pacientes evoluíram com choque e óbito. É possível que elas tenham contribuído para estes desfechos, dentro de um contexto de deterioração clínica multifatorial, com diversas outras disfunções associadas.

O achado de miocardites nesta coorte corrobora os já descritos anteriormente.<sup>22,42,48,50</sup> Chan e cols descreveram miocardite em autópsia de um paciente do sexo masculino, australiano, de 56 anos, com quadro de DVA-VFA; Fabro e cols. descreveram miocardite subclínica em autópsias de dois pacientes brasileiros, do sexo masculino, de 36 e 52 anos, não vacinados, falecidos por FA silvestre; Paixao e cols. descreveram suspeita de miocardite em um paciente após avaliação por ressonância magnética cardíaca; Ho e cols. observaram 2 casos de miocardite grave internados na UTI. Já houve descrição de miocardite em outras arboviroses, como dengue, zika e chikungunya.<sup>66,68,70,71,100</sup> A proporção de casos em que se observou miocardite é semelhante a uma coorte de autópsia de COVID-19.<sup>101</sup>

**5.4- Na FA grave, observa-se uma lesão endotelial difusa no coração, semelhante ao que ocorre na sepse grave. Em alguns casos, há evidências de infecção da célula endotelial pelo vírus da FA.**

A lesão endotelial é uma característica importante das arboviroses, em especial da dengue. Foi feita a hipótese de que parte do dano cardiovascular e sistêmico da FA também pudesse ser explicado por endoteliopatia difusa. Na histopatologia, a grande maioria dos casos apresentaram algum grau de lesão endotelial, predominando edema, seguido por necrose fibrinóide. Raros casos apresentaram vasculite ou trombose vascular. Foi realizada IHQ para angiopoietina-2 que mostrou marcação frequente, maior que em controles. Em alguns casos, foi identificada marcação de antígeno viral e presença de vírions no citoplasma de células endoteliais.



A avaliação proteômica de componentes do endotélio vascular, mostrou maior concentração de angiopoietina-2, endotelina-1, syndecan-1 e VCAM-1 em relação aos controles de morte cardiovascular. A angiopoietina-2 é um fator de crescimento vascular que contribui para o aumento da permeabilidade capilar no contexto de sepse. Foi demonstrada associação do aumento de seus níveis com disfunções orgânicas e pior prognóstico, inclusive maior mortalidade.<sup>102</sup> A endotelina-1 é um peptídeo de ação vasoconstrictora, importante na homeostase do tônus vascular. Em contexto de sepse, seus elevados níveis podem contribuir para a ativação de vias inflamatórias e aumento da síntese de IL-1, TNF- $\alpha$  e IL-6.<sup>103,104</sup> Syndecan-1 é uma proteína transmembrana componente do glicocálix, que interage com fatores de crescimento e quimiocinas. Níveis séricos elevados correlacionam-se com lesão endotelial e estão relacionados a pior prognóstico na sepse.<sup>105</sup> VCAM-1 é uma molécula de adesão celular e também há associação de seu elevado nível sérico com pior prognóstico na sepse.<sup>106</sup> Em relação aos marcadores mais relacionados à trombose e hemostasia, houve aumento da concentração tecidual de PAI-1, proteína que inibe a fibrinólise, em comparação com os controles de morte cardiovascular. Este marcador está classicamente elevado em casos de sepse e se associa a coagulação intravascular disseminada. Não houve diferença em relação aos controles com sepse.

Esses resultados sugerem que a lesão endotelial é frequente e difusa, com aumento da concentração de fatores angiogênicos, vasoconstrictores e pró-trombóticos, classicamente associados a sepse e inflamação. A interação da proteína NS1, característica dos flavivirus, com o glicocálix pode explicar parte da lesão. O uso de drogas vasoativas em altas doses, por períodos prolongados, certamente contribui para a desregulação microvascular. Invasão viral direta é uma hipótese, frente aos achados de IHQ e microscopia eletrônica, que necessita de confirmação em modelos celulares e animais. Inflamação, com recrutamento de leucócitos, e expressão de moléculas de adesão, também potencialmente participam da etiologia multifatorial da lesão endotelial.

### **5.5- Há substrato histológico no sistema de condução que justifique bradicardia e sinal de Faget**

Desde a descrição do sinal de Faget, a presença de bradicardia e bradiarritmias foi descrita múltiplas vezes na FA, porém sem compreensão adequada de seus mecanismos.<sup>47-51</sup> Neste estudo, também mostramos elevada frequência de bradicardias clinicamente ou registradas em eletrocardiograma. Representamos histologicamente o sistema de condução de oito pacientes, com o objetivo de avaliar as alterações histológicas que pudessem auxiliar no entendimento do processo fisiopatológico. Foi observada alta proporção de casos com edema e hemorragias próximas a diferentes segmentos do sistema de condução. Também observamos necrose fibrinóide da artéria do NSA em dois casos e fibrose do NSA em outros dois. Em um caso, foi observado infiltrado inflamatório no sistema de condução cardíaco. Tais achados podem interferir tanto no automatismo do NSA, bem como na condução elétrica do restante do sistema, levando a bradicardia e bloqueios. É descrita a associação entre hemorragia no sistema de condução e ocorrência de arritmias tanto em modelos animais quanto em pacientes.<sup>107,108</sup> É provável que alterações sistêmicas como hipotensão, hipóxia e distúrbios hidroeletrólíticos também contribuam para este desfecho. Estudos de eletrofisiologia com modelos animais podem auxiliar no melhor esclarecimento dos fenômenos descritos.

### **5.6- Casos vacinais têm características semelhantes aos silváticos, porém com alta prevalência de miocardite**

Foram incluídos 5 pacientes com DVA-VFA. Todos esses pacientes foram vacinados até 5 dias antes do início dos sintomas, próximo ao intervalo habitual, que é de 3 a 4 dias, e tiveram quadros clínicos semelhantes aos demais pacientes. Na avaliação histopatológica não houve achados específicos para esses pacientes. No entanto, destaca-se a alta proporção de miocardites, encontrada em 4 pacientes com DVA-VFA. As análises de imunohistoquímica e de proteômica também foram semelhantes aos casos silváticos para a maioria dos marcadores; houve diferença estatisticamente significativa somente na contagem de células CD8+ e na concentração de IFN- $\gamma$ , maiores no grupo vacinal.

A DVA-VFA é uma complicação rara da vacina contra a FA, com incidência estimada em 0,25-0,4 casos por 100.000 vacinados. Há replicação descontrolada do vírus vacinal nos tecidos, levando a quadro clínico e complicações semelhantes ao da FA silvática.<sup>109</sup> Já foi descrita anteriormente a patologia de pacientes falecidos por DVA-VFA em relatos ou séries de dois casos, inclusive com descrição de miocardite viral.<sup>21,22,25,26,39,43,110</sup> Nos trabalhos anteriores, também foram reportados achados histopatológicos semelhantes aos da FA silvática nos diversos tecidos avaliados. Este é o trabalho que reúne o maior número de pacientes com a forma vacinal submetidos à autópsia.

Em relação ao status vacinal dos pacientes diagnosticados FA pela cepa silvática, 14 (19,2%) relataram terem sido vacinados, entretanto somente 2 (2,7%) foram vacinados mais de 10 dias antes do início dos sintomas, o que caracteriza falha vacinal. A vacina 17D para febre amarela é extremamente segura e eficaz. O diagnóstico de DVA-VFA no contexto de um surto ou epidemia é complexo, pois exige que seja descartada a infecção por vírus silvático, já que a identificação da cepa vacinal pode representar apenas status vacinal recente do indivíduo.

### 5.7- Limitações do estudo

Algumas limitações deste estudo:

- a) A coleta dos dados clínicos foi realizada de forma retrospectiva, a partir de prontuários médicos, cujas informações são dependentes da qualidade do preenchimento pela equipe médica assistente. A realização de exames complementares em apenas uma parte da casuística, conforme critério clínico, pode caracterizar um viés, supondo-se que somente aqueles com maior probabilidade de alterações cardíacas tiveram exames solicitados.
- b) A realização do transcriptoma das amostras cardíacas dos casos de FA não pôde ser realizada devido à baixa integridade do RNA (APÊNDICE A). Este fenômeno é frequente em estudos de autópsia, e deve-se ao tempo *post-mortem* antes da coleta dos tecidos, associada a procedimentos de congelamento e descongelamento.
- c) As alterações patológicas de qualquer entidade nosológica humana, descritas através de estudos de autópsias, refletem o período final da história natural de

uma doença. Considerações sobre evolução de processos patogênicos, nem sempre são possíveis. É possível que parte das alterações descritas decorram de sepse, associada à própria FA. Infecções bacterianas são complicações comuns da falência hepática aguda, por bactérias provenientes principalmente da translocação bacteriana intestinal e por pneumonia aspirativa. No entanto, há evidências, por meio de biologia molecular e IHQ da ação do vírus da FA no miocárdio de casos de FA fatal. Estudos prospectivos, possíveis apenas através de modelos experimentais da doença, poderão esclarecer quais alterações cardíacas decorrem essencialmente do vírus da FA e quais são decorrentes da ação conjunta do arbovírus e da repercussão sistêmica da sepse.

#### **5.8- Impacto e perspectivas em uma doença tropical negligenciada**

Há uma carência de publicações no tocante às doenças tropicais negligenciadas, vítimas de subfinanciamento global à pesquisa. A FA, ainda que uma condição de importância histórica, com estudos centenários, permanece com diversas lacunas de conhecimento. As consequências mais concretas são dificuldades no controle do vetor, subdiagnóstico e ausência de um tratamento efetivo, levando a mais de 30.000 mortes anualmente em decorrência da doença.<sup>3</sup> Surtos e epidemias em regiões não endêmicas, como a ocorrida na cidade de São Paulo em 2017-2019, acendem o alerta para o potencial de reemergência da doença em diversas localidades e para a necessidade de uma ação global coordenada de enfrentamento. Ainda assim, esta epidemia resultou na oportunidade de aprofundar o conhecimento da patologia da doença, permitindo a realização de diversos estudos, à luz de metodologias científicas modernas em Medicina.

O presente estudo pôde confirmar a hipótese de que a FA causa acometimento cardíaco frequente em casos fatais, descrevendo a lesão miocárdica associada e explorando seus mecanismos. Algumas alterações têm caráter inespecífico, semelhante às encontradas na sepse bacteriana, sugerindo um componente de lesão indireta, secundária a um processo sistêmico de inflamação e choque. Já a presença de vírus no tecido, com lesão endotelial, infiltrado inflamatório e casos de miocardite viral, sugere um componente *in situ* direto de lesão.

Os achados deste estudo podem ter impacto clínico. Dada a alta prevalência de alterações cardíacas, ressalta-se a importância de monitoramento de parâmetros cardiovasculares como sinais vitais e ritmo cardíaco, em casos graves. Sugere-se uma avaliação mais detalhada, com exames complementares como eletrocardiograma, ecocardiograma e troponina, caso haja alterações nesses parâmetros ou sintomas sugestivos de acometimento cardíaco. Em casos suspeitos de miocardite, pode ser considerada a avaliação por ressonância nuclear magnética. O diagnóstico precoce das complicações cardiovasculares pode levar a um tratamento de suporte mais eficaz, atuando no manejo dessas complicações, ainda que a terapia para o agente etiológico permaneça indisponível.

Como perspectivas, estudos prospectivos podem elucidar alguns achados e hipóteses aqui descritos. Estudos *in vitro* e *in vivo*, com modelos animais da doença, devem ser explorados à luz das técnicas contemporâneas, observando-se de forma simultânea a cinética viral e as alterações em diferentes sistemas, incluindo o cardiovascular. A avaliação multi-ômica dos tecidos também pode auxiliar a esclarecer mecanismos patogênicos com maior precisão.

## **6-CONCLUSÕES**

---

### 6.1- Conclusões sumarizadas

- a) A FA é uma doença sistêmica que acomete o coração, com alta prevalência de manifestações clínicas e alterações histopatológicas cardíacas em casos fatais.
- b) A lesão cardíaca associada à FA é marcada por necrose de fibras, infiltrado inflamatório, lesão endotelial, hemorragia, edema e miocardite, com presença de antígeno e RNA viral no tecido miocárdico dos pacientes.
- c) Há intensa inflamação no tecido miocárdico desses pacientes, demonstrado através da análise proteômica e imunohistoquímica, semelhante à sepse bacteriana, que pode contribuir para explicar parte das alterações observadas.
- d) Há miocardite viral pela FA em alguns casos, de característica predominantemente linfomonocítica, com gravidade e relevância clínica incertas.
- e) IP-10 mostrou-se um biomarcador tecidual característico, que diferenciou a injúria miocárdica associada à febre amarela da lesão associada à sepse bacteriana.
- f) Há lesão endotelial no coração determinada histologicamente em grande proporção de casos, com elevada concentração de marcadores angiogênicos, vasoconstritores e pró-trombóticos, associados a lesões orgânicas e a um pior prognóstico em quadros sépticos. Há sinais sugestivos de invasão viral direta às células endoteliais.
- g) Há edema, hemorragia, alterações vasculares e fibrose no sistema de condução dos pacientes falecidos por FA, achados que podem contribuir para a ocorrência de bradicardia e arritmias.

### 6.2- Conclusão final

A FA causa frequente lesão cardíaca clínica e histopatológica em casos graves. Tal injúria decorre de mecanismos multifatoriais, incluindo a ação direta do vírus da FA no tecido cardíaco, o processo inflamatório *in situ* e sistêmico, e a lesão de células endoteliais.

## **7-REFERÊNCIAS**

---



1. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015;64:160–73.
2. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA*. 27 de agosto de 2008;300(8):960–2.
3. Tuells J, Henao-Martínez AF, Franco-Paredes C. Yellow fever: A perennial threat. *Arch Med Res*. novembro de 2022;53(7):649–57.
4. LaBeaud AD. Why arboviruses can be neglected tropical diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 25 de junho de 2008;2(6):e247.
5. Eliminate Yellow fever Epidemics (EYE): a global strategy, 2017–2026. *Wkly Epidemiol Rec*. 21 de abril de 2017;92(16):193–204.
6. Possas C, Lourenço-de-Oliveira R, Tauil PL, Pinheiro F de P, Pissinatti A, Cunha RV da, et al. Yellow fever outbreak in Brazil: the puzzle of rapid viral spread and challenges for immunisation. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 3 de setembro de 2018;113(10):e180278.
7. Cunha MDP, Duarte-Neto AN, Pour SZ, Ortiz-Baez AS, Černý J, Pereira BB de S, et al. Origin of the São Paulo Yellow Fever epidemic of 2017–2018 revealed through molecular epidemiological analysis of fatal cases. *Sci Rep*. 31 de dezembro de 2019;9(1):20418.
8. Dados Estatísticos - Secretaria da Saúde - Governo do Estado de São Paulo [Internet]. [citado 16 de março de 2023]. Disponível em: <http://saude.sp.gov.br/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica-prof.-alexandre-vranjac/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/agrivos/febre-amarela/dados-estatisticos>
9. Areas with risk of Yellow Fever virus transmission in south America [Internet]. 2019 [citado 15 de fevereiro de 2023]. Disponível em: [https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south\\_america.html](https://www.cdc.gov/yellowfever/maps/south_america.html)
10. Cunha MS, Tubaki RM, de Menezes RMT, Pereira M, Caleiro GS, Coelho E, et al. Possible non-sylvatic transmission of yellow fever between non-human primates in São Paulo city, Brazil, 2017–2018. *Sci Rep*. 25 de setembro de

2020;10(1):15751.

11. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med.* março de 2010;30(1):237–60.
12. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res.* 1º de abril de 2008;78(1):116–24.
13. Councilman WT. Report on etiology and prevention of yellow fever. *Public Health Bulletin* . 1890;2:151–9.
14. Rocha-Lima H. Zur pathologischen Anatomie des Gelbfiebers. *Verh dtsch path.* 1912;15:163–82.
15. Torres CM. Intranuclear Inclusions ") in Yellow Fever. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 1931;25(2):81–211.
16. Klotz O, Belt TH. The pathology of the liver in yellow fever. *Am J Pathol.* novembro de 1930;6(6):663–88.1.
17. Villela E. Histology of Human Yellow Fever when Death is Delayed. *Arch Pathol.* 1941;(6).
18. Poon-King TMW. A clinico-pathological study of yellow fever with demonstration of the virus in human liver. 1991;53–8.
19. Brito D, Siqueira T, Santos S, Nassar R, Coimbra ES, Alves T. Human fatal yellow fever: : Immunohistochemical Detection of Viral Antigens in the Liver, Kidney and Heart. *Pathol Res Pract.* 1992;188(1-2):177–81.
20. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HFJ, Vasconcelos PFC, et al. Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* 2007;101(2):161–8.
21. Vasconcelos PF, Luna EJ, Galler R, Silva LJ, Coimbra TL, Barros VL, et al. Serious adverse events associated with yellow fever 17DD vaccine in Brazil: a report of two cases. *Lancet.* 14 de julho de 2001;358(9276):91–7.
22. Chan RC, Penney DJ, Little D, Carter IW, Roberts JA, Rawlinson WD. Hepatitis

- and death following vaccination with 17D-204 yellow fever vaccine. *Lancet*. 14 de julho de 2001;358(9276):121–2.
23. McFarland JM, Baddour LM, Nelson JE. Fatal yellow fever in a traveler returning from Venezuela, 1999. *MMWR*. 1999;49:303–5.
  24. De Filippis A, Nogueira R, Jabor A, Schatzmayr H, Oliveira J, Dinis S, et al. Isolation and characterization of wild type yellow fever virus in cases temporally associated with 17DD vaccination during an outbreak of yellow fever in Brazil. *Vaccine*. 2004;22:1073–8.
  25. Whittembury A, Ramirez G, Hernández H, Ropero AM, Waterman S, Ticona M, et al. Viscerotropic disease following yellow fever vaccination in Peru. *Vaccine*. 9 de outubro de 2009;27(43):5974–81.
  26. Duarte-Neto AN, Monteiro RA de A, Johnsson J, Cunha MDP, Pour SZ, Saraiva AC, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsy as a tool for rapid post-mortem diagnosis in the 2018 Sao Paulo yellow fever epidemic: Correlation with conventional autopsy. *PLoS Negl Trop Dis*. julho de 2019;13(7):e0007625.
  27. Marinho PES, Alvarenga PPM, Crispim APC, Candiani TMS, Alvarenga AM, Bechler IM, et al. Wild-type yellow fever virus rna in cerebrospinal fluid of child. *Emerg Infect Dis*. 2019;25(8):1567–70.
  28. Duarte-Neto AN, Cunha M dos P, Marcilio I, Song ATW, Martino RB, Ho YL, et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. *Histopathology*. novembro de 2019;75(5):638–48.
  29. Pierrotti LC, Duarte-Neto AN, Song A, Ventura CG, David-Neto E, Azevedo LS. *Clinical Infectious Diseases : An Official Publication of the Infectious Diseases Society of America*. 2020;70:144–8.
  30. Seidelin H. The histology of the liver in yellow fever. *Bulletin of the Yellow Fever Bureau*. 1915;3(194):268–98.
  31. Elton NW, Romero A, Trejos A. *Clinical Pathology of Yellow Fever*. *Am J Clin*

- Pathol. 1955;25(2):135–46.
32. Camain R, Lambert D. Histopathologie des foies amarils prélevés post-mortem et par fonction biopsie hépatique au cours de l'épidémie de Diourbel (Sénégal). Bull Soc Méd Afr Noire Lgue fr, t XI. 1966;522–40.
  33. Cardeman L, Kastener MRQ, Cardeman S, Queraltó MCK. Febre amarela II - Estudo histopatológico do fígado. Rev Soc Bras Med Trop. 1976;10:69–75.
  34. Vieira WT, Gayotto LC, de Lima CP, de Brito T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. Histopathology. março de 1983;7(2):195–208.
  35. da Costa Lopes J, Falcão LFM, Martins Filho AJ, Carvalho MLG, Mendes CCH, Olímpio FA, et al. Factors Involved in the Apoptotic Cell Death Mechanism in Yellow Fever Hepatitis. Viruses [Internet]. 1º de junho de 2022;14(6). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v14061204>
  36. Muñoz E, Morón C, Kemper R, Román R. Inmunohistoquímica en el diagnóstico de fiebre amarilla. An Fac Med Lima. 6 de março de 2013;65(3):194.
  37. Dias LB Jr, Alves VAF, Kanamura C, Oikawa RTC, Wakamatsu A. Fulminant hepatic failure in northern Brazil: morphological, immunohistochemical and pathogenic aspects of Lábrea hepatitis and yellow fever. Trans R Soc Trop Med Hyg. agosto de 2007;101(8):831–9.
  38. Campos S, Thiel F, Bellassai S, Rodríguez J. Experiencia en el Dpto. de Patología, del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud y la Cátedra de Anatomía Patológica. Facultad de Ciencias Medicas. 2009;7:33–9.
  39. Desilva M, Sharma A, Staples E, Arndt B, Shieh WJ, Shames J, et al. Centers for Disease C, Prevention. Notes from the field: fatal yellow fever vaccine-associated viscerotropic disease--Oregon. MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2014;64:279–81.
  40. Maciel GVR, Tavares MC de F, Pereira LS, Silva GLC, de Oliveira NR, Paulino E Júnior, et al. Disseminated mycosis in a patient with yellow fever. Autops Case Rep. julho de 2018;8(3):e2018038.

41. Klotz O, Belt TH. The pathology of the spleen in yellow fever. *Am J Pathol.* novembro de 1930;6(6):655–62.3.
42. Fabro AT, Engelman GG, Ferreira NN, Velloni JMF, Espósito DLA, da Fonseca BAL, et al. Yellow fever-induced acute lung injury. *Am J Respir Crit Care Med.* 15 de julho de 2019;200(2):250–2.
43. Breda GL, Domino NR, De Noronha L, Duarte Dos Santos CN, Zanluca C, Kruger RS, et al. Invasive aspergillosis complication in yellow fever vaccine induced viscerotropic disease. *Med Mycol Case Rep.* 2020;30:12–4.
44. Centers for Disease Control and Prevention. *CDC Health Information for International Travel 2014: The Yellow Book.* Oxford University Press; 2013. 640 p.
45. Duarte-Neto AN, Ferraz da Silva LF, Monteiro RA de A, Theodoro Filho J, Leite TLLF, de Moura CS, et al. Ultrasound-guided minimally invasive tissue sampling: A minimally invasive autopsy strategy during the COVID-19 pandemic in Brazil, 2020. *Clin Infect Dis.* 15 de dezembro de 2021;73(Suppl\_5):S442–53.
46. Monteiro RA de A, Duarte-Neto AN, Silva LFF da, Oliveira EP de, Filho JT, Santos GABD, et al. Ultrasound-guided minimally invasive autopsies: A protocol for the study of pulmonary and systemic involvement of COVID-19. *Clinics.* 29 de maio de 2020;75(e1972):e1972.
47. Horspool R, Cadogan M, Cadogan RHA. Jean-Charles Faget [Internet]. *Life in the Fast Lane • LITFL. Life in the Fast Lane LITFL; 2019 [citado 27 de dezembro de 2022].* Disponível em: <https://litfl.com/jean-charles-faget/>.
48. Paixão GMM, Nunes MCP, Beato BDVG, Sable C, Beaton AZ, Oliveira KKB, et al. Cardiac involvement by Yellow Fever(from the PROVAR+ study). *Am J Cardiol.* 1º de março de 2019;123(5):833–8.
49. de Ávila RE, José Fernandes H, Barbosa GM, Araújo AL, Gomes TCC, Barros TG, et al. Clinical profiles and factors associated with mortality in adults with yellow fever admitted to an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis.* abril de 2020;93:90–7.

50. Ho YL, Joelsons D, Leite GFC, Malbouisson LMS, Song ATW, Perondi B, et al. Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. *J Travel Med* [Internet]. 11 de junho de 2019;26(5). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1093/jtm/taz040>
51. Lloyd W. The myocardium in yellow fever: I. The myocardial function in experimental yellow fever. *Am Heart J*. 1931;6(4):483–503.
52. Lloyd W. The myocardium in yellow fever: II. The myocardial lesions in experimental yellow fever. *Am Heart J*. 1931;6(4):504–16.
53. Cannell DE. Myocardial degenerations in yellow fever. *Am J Pathol*. setembro de 1928;4(5):431–43.
54. Xiao SY, Zhang H, Guzman H, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *J Infect Dis*. 15 de maio de 2001;183(10):1437–44.
55. Tesh RB, Guzman H, da Rosa AP, Vasconcelos PF, Dias LB, Bunnell JE, et al. Experimental yellow fever virus infection in the Golden Hamster (*Mesocricetus auratus*). I. Virologic, biochemical, and immunologic studies. *J Infect Dis*. 15 de maio de 2001;183(10):1431–6.
56. Leal SG, Romano APM, Monteiro RV, Melo CB de, Vasconcelos PF da C, Castro MB de. Frequency of histopathological changes in Howler monkeys (*Alouatta* sp.) naturally infected with yellow fever virus in Brazil. *Rev Soc Bras Med Trop*. fevereiro de 2016;49(1):29–33.
57. Li G, Duan T, Wu X, Tesh RB, Soong L, Xiao SY. Yellow fever virus infection in Syrian golden hamsters: relationship between cytokine expression and pathologic changes. *Int J Clin Exp Pathol*. 1º de janeiro de 2008;1(2):169–79.
58. Klotz O, Beltt H. The identity of yellow fever lesions in Africa and America. *The Am. J Trop Med*. 1930;5:299–304.
59. Noguchi H. Etiology of yellow fever : lii. Symptomatology and pathological findings in animals experimentally infected. *J Exp Med*. 1º de junho de 1919;29(6):585–

- 96.
60. Habimana R, Choi I, Cho HJ, Kim D, Lee K, Jeong I. Sepsis-induced cardiac dysfunction: a review of pathophysiology. *Acute Crit Care*. maio de 2020;35(2):57–66.
61. Merx MW, Weber C. Sepsis and the heart. *Circulation*. 14 de agosto de 2007;116(7):793–802.
62. Kakihana Y, Ito T, Nakahara M, Yamaguchi K, Yasuda T. Sepsis-induced myocardial dysfunction: pathophysiology and management. *J Intensive Care Med*. 23 de março de 2016;4:22.
63. Bi CF, Liu J, Yang LS, Zhang JF. Research Progress on the Mechanism of Sepsis Induced Myocardial Injury. *J Inflamm Res*. 26 de julho de 2022;15:4275–90.
64. Razazi K, Boissier F, Surenaud M, Bedet A, Seemann A, Carteaux G, et al. A multiplex analysis of sepsis mediators during human septic shock: a preliminary study on myocardial depression and organ failures [Internet]. Vol. 9, *Annals of Intensive Care*. 2019. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13613-019-0538-3>
65. Aletti M, Lecoules S, Kanczuga V, Soler C, Maquart M, Simon F, et al. Transient myocarditis associated with acute Zika virus infection. *Clin Infect Dis*. 1º de março de 2017;64(5):678–9.
66. Minhas AM, Nayab A, Iyer S, Narmeen M, Fatima K, Khan MS, et al. Association of Zika virus with myocarditis, heart failure, and arrhythmias: A literature review. *Cureus*. 27 de junho de 2017;9(6):e1399.
67. Characterization of a 2016 Clinical Isolate of Zika Virus in Non-human Primates. *EBioMedicine*. 1º de outubro de 2016;12:170–7.
68. Lvarez MF, Bolívar-Mejía A, Rodríguez-Morales AJ, Ramirez-Vallejo E. Cardiovascular involvement and manifestations of systemic Chikungunya virus infection: a systematic review. *Version*. 2017;6:390–390.
69. Thiruvengadam KV, Kalyanasundaram V, Rajgopal J. Clinical and pathological

- studies on chikungunya fever in Madras city. *Indian J Med Res.* agosto de 1965;53(8):729–44.
70. Nagaratnam N, Siripala K, de Silva N. Arbovirus (dengue type) as a cause of acute myocarditis and pericarditis. *Br Heart J.* fevereiro de 1973;35(2):204–6.
71. Miranda CH, Borges M de C, Schmidt A, Pazin-Filho A, Rossi MA, Ramos SG, et al. A case presentation of a fatal dengue myocarditis showing evidence for dengue virus-induced lesion. *Eur Heart J Acute Cardiovasc Care.* junho de 2013;2(2):127–30.
72. Khongphatthanayothin A, Lertsapcharoen P, Supachokchaiwattana P, Satupan P, Thongchaiprasit K, Poovorawan Y, et al. Hepatosplanchnic circulatory dysfunction in acute hepatic infection: the case of dengue hemorrhagic fever. *Shock.* novembro de 2005;24(5):407–11.
73. Domínguez-Alemán CA, Sánchez-Vargas LA, Hernández-Flores KG, Torres-Zugaide AI, Reyes-Sandoval A, Cedillo-Barrón L, et al. Dengue Virus Induces the Expression and Release of Endocan from Endothelial Cells by an NS1–TLR4-Dependent Mechanism. *Microorganisms.* 15 de junho de 2021;9(6):1305.
74. Suwanto S, Sasmono RT, Sinto R, Ibrahim E, Suryamin M. Association of Endothelial Glycocalyx and Tight and Adherens Junctions With Severity of Plasma Leakage in Dengue Infection. *J Infect Dis.* 15 de março de 2017;215(6):992–9.
75. Puerta-Guardo H, Glasner DR, Harris E. Dengue Virus NS1 Disrupts the Endothelial Glycocalyx, Leading to Hyperpermeability. *PLoS Pathog.* julho de 2016;12(7):e1005738.
76. Rehm M, Bruegger D, Christ F, Conzen P, Thiel M, Jacob M, et al. Shedding of the endothelial glycocalyx in patients undergoing major vascular surgery with global and regional ischemia. *Circulation.* 23 de outubro de 2007;116(17):1896–906.
77. Barichello T, Generoso JS, Singer M, Dal-Pizzol F. Biomarkers for sepsis: more than just fever and leukocytosis—a narrative review. *Crit Care.* 6 de janeiro de 2022;26(1):14.



78. Liu YC, Yu MM, Shou ST, Chai YF. Sepsis-Induced Cardiomyopathy: Mechanisms and Treatments. *Front Immunol.* 24 de agosto de 2017;8:1021.
79. Faiotto VB, Franci D, Enz Hubert RM, de Souza GR, Fiusa MML, Hounkpe BW, et al. Circulating levels of the angiogenesis mediators endoglin, HB-EGF, BMP-9 and FGF-2 in patients with severe sepsis and septic shock. *J Crit Care.* dezembro de 2017;42:162–7.
80. Basso C, Michaud K, d'Amati G, Banner J, Lucena J, Cunningham K, et al. Cardiac hypertrophy at autopsy. *Virchows Arch.* julho de 2021;479(1):79–94.
81. Kim Suvarna S. *Cardiac Pathology: A Guide to Current Practice.* Springer Nature; 2019. 323 p.
82. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. *Robbins & Cotran Pathologic Basis of Disease.* Elsevier; 2020. 1392 p.
83. Aretz HT, Billingham ME, Edwards WD, Factor SM, Fallon JT, Fenoglio JJ Jr, et al. Myocarditis. A histopathologic definition and classification. *Am J Cardiovasc Pathol.* janeiro de 1987;1(1):3–14.
84. Magalhães LP, Guimarães I, Melo SL, Mateo E, Andalaft RB, Xavier L, et al. [Not Available]. *Arq Bras Cardiol.* julho de 2016;107(1 Suppl 3):1–58.
85. Anderson RH, Ho SY, Becker AE. The surgical anatomy of the conduction tissues. *Thorax.* junho de 1983;38(6):408–20.
86. Duarte-Neto AN, Cunha MDP, Marcilio I, Song ATW, De Martino RB, Ho YL, et al. Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. *Histopathology.* 2019;75(5):638–48.
87. Duarte MI, Mariano ON, Takakura CF, Everson D, Corbett CE. A fast method for processing biologic material for electron microscopic diagnosis in infectious disease. *Ultrastruct Pathol.* julho de 1992;16(4):475–82.
88. Diallo D, Sall AA, Diagne CT, Faye O, Hanley KA, Buenemann M, et al. Patterns of a sylvatic yellow fever virus amplification in southeastern Senegal, 2010. *Am J Trop Med Hyg.* junho de 2014;90(6):1003–13.

89. Chagal K, Veria S, Mack S, Paternite D, Sheikh SA, Patel M, et al. Myocardial injury in hospitalized COVID-19 patients: a retrospective study, systematic review, and meta-analysis. *BMC Cardiovasc Disord* [Internet]. dezembro de 2021;21(1). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s12872-021-02450-3>
90. Schmittinger CA, Dünser MW, Torgersen C, Luckner G, Lorenz I, Schmid S, et al. Histologic pathologies of the myocardium in septic shock. *Shock*. abril de 2013;39(4):329–35.
91. Quaresma JAS, Pagliari C, Medeiros DBA, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Immunity and immune response, pathology and pathologic changes: progress and challenges in the immunopathology of yellow fever. *Rev Med Virol*. setembro de 2013;23(5):305–18.
92. de-Oliveira-Pinto LM, Gandini M, Freitas LP, Siqueira MM, Marinho CF, Setúbal S, et al. Profile of circulating levels of IL-1Ra, CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 $\beta$  and CCL2/MCP-1 in dengue fever and parvovirus. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. fevereiro de 2012;107(1):48–56.
93. Bunprakob S, Hemachudha P, Ruchisrisarod C, Supharatpariyakorn T, Hemachudha T. IP-10 and complement activation as friend or foe in COVID-19. *Int J Immunopathol Pharmacol*. Jan-Dec de 2022;36:3946320221096202.
94. Başar EZ, Sönmez HE, Uzuner H, Karadenizli A, Güngör HS, Akgün G, et al. CXCL10/IP10 as a Biomarker Linking Multisystem Inflammatory Syndrome and Left Ventricular Dysfunction in Children with SARS-CoV-2. *J Clin Med Res* [Internet]. 4 de março de 2022;11(5). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/jcm11051416>
95. Naveca FG, Pontes GS, Chang AYH, Silva GAV da, Nascimento VA do, Monteiro DC da S, et al. Analysis of the immunological biomarker profile during acute Zika virus infection reveals the overexpression of CXCL10, a chemokine linked to neuronal damage. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 14 de maio de 2018;113(6):e170542.
96. Chen Y, Wang J, Liu C, Su L, Zhang D, Fan J, et al. IP-10 and MCP-1 as biomarkers associated with disease severity of COVID-19. *Mol Med*. 29 de outubro de 2020;26(1):97.

97. Yuan J, Liu Z, Lim T, Zhang H, He J, Walker E, et al. CXCL10 inhibits viral replication through recruitment of natural killer cells in coxsackievirus B3-induced myocarditis. *Circ Res*. 13 de março de 2009;104(5):628–38.
98. Elemam NM, Talaat IM, Maghazachi AA. CXCL10 Chemokine: A Critical Player in RNA and DNA Viral Infections. *Viruses* [Internet]. 3 de novembro de 2022;14(11). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.3390/v14112445>
99. Sagar S, Liu PP, Cooper LT Jr. Myocarditis. *Lancet*. 25 de fevereiro de 2012;379(9817):738–47.
100. Lemant J, Boisson V, Winer A, Thibault L, André H, Tixier F, et al. Serious acute chikungunya virus infection requiring intensive care during the Reunion Island outbreak in 2005-2006. *Crit Care Med*. setembro de 2008;36(9):2536–41.
101. Basso C, Leone O, Rizzo S, De Gaspari M, van der Wal AC, Aubry MC, et al. Pathological features of COVID-19-associated myocardial injury: a multicentre cardiovascular pathology study. *Eur Heart J*. 14 de outubro de 2020;41(39):3827–35.
102. Akwii RG, Sajib MS, Zahra FT, Mikelis CM. Role of angiotensin-2 in vascular physiology and pathophysiology. *Cells*. 17 de maio de 2019;8(5):471.
103. Lambden S, Creagh-Brown BC, Hunt J, Summers C, Forni LG. Definitions and pathophysiology of vasoplegic shock. *Crit Care* [Internet]. dezembro de 2018;22(1). Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1186/s13054-018-2102-1>
104. Kowalczyk A, Kleniewska P, Kolodziejczyk M, Skibska B, Goraca A. The role of endothelin-1 and endothelin receptor antagonists in inflammatory response and sepsis. *Arch Immunol Ther Exp* . fevereiro de 2015;63(1):41–52.
105. Sun T, Wang Y, Wu X, Cai Y, Zhai T, Zhan Q. Prognostic value of syndecan-1 in the prediction of sepsis-related complications and mortality: A meta-analysis. *Front Public Health*. 11 de abril de 2022;10:870065.
106. Amalakuhan B, Habib SA, Mangat M, Reyes LF, Rodriguez AH, Hinojosa CA, et al. Endothelial adhesion molecules and multiple organ failure in patients with

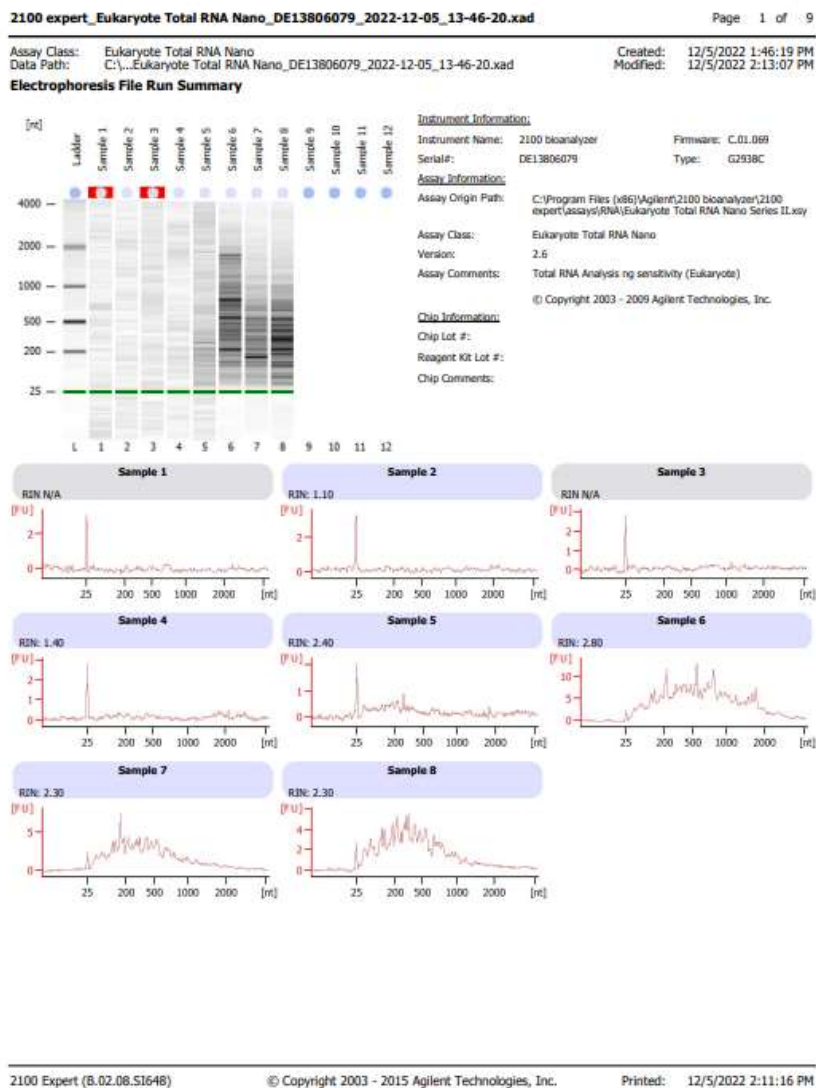
severe sepsis. *Cytokine*. dezembro de 2016;88:267–73.

107. Thung N, Dammann JF Jr, Diaz-Perez R, Thompson WM Jr, Sanmarco M, Mehegan C. Hypoxia as the cause of hemorrhage into the cardiac conduction system, arrhythmia, and sudden death. *J Thorac Cardiovasc Surg*. novembro de 1962;44:687–95.
108. Clark RE, Christlieb I, Sanmarco M, Diaz-Prez R, Dammann JF. Relationship of Hypoxia to Arrhythmia and Cardiac Conduction Hemorrhage: An Experimental Study. *Circulation*. abril de 1963;XXVII:742–7.
109. Manual de Vigilância Epidemiológica de Eventos Adversos Pós-Vacinação [Internet]. [citado 7 de abril de 2023]. Disponível em: <https://www.gov.br/saude>
110. Monath TP. Suspected yellow fever vaccine-associated viscerotropic adverse events (1973 and 1978), United States. *Am J Trop Med Hyg*. maio de 2010;82(5):919–21.

## **8-APÊNDICES**

---

## APÊNDICE A – Avaliação da integridade do RNA



Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad  
 Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
 Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

**Electrophoresis File Run Summary (Chip Summary)**

Sample Name	Sample Comment	Status	Result Label	Result Color
Sample 1		✓	RIN: N/A	
Sample 2		✓	RIN: 1.10	
Sample 3		✓	RIN: N/A	
Sample 4		✓	RIN: 1.40	
Sample 5		✓	RIN: 2.40	
Sample 6		✓	RIN: 2.80	
Sample 7		✓	RIN: 2.30	
Sample 8		✓	RIN: 2.30	
Sample 9				
Sample 10				
Sample 11				
Sample 12				
Ladder		✓	All Other Samples	

Chip Lot #

Reagent Kit Lot #

Chip Comments :

2100 expert\_Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Page 3 of 9

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

**Electrophoresis Assay Details****General Analysis Settings**

Number of Available Sample and Ladder Wells (Max.): 13  
Minimum Visible Range [s]: 17  
Maximum Visible Range [s]: 70  
Start Analysis Time Range [s]: 19  
End Analysis Time Range [s]: 69  
Ladder Concentration [ng/ $\mu$ l]: 150  
Lower Marker Concentration [ng/ $\mu$ l]: 0  
Upper Marker Concentration [ng/ $\mu$ l]: 0  
Used Lower Marker for Quantitation  
Standard Curve Fit is Logarithmic  
Show Data Aligned to Lower Marker

**Integrator Settings**

Integration Start Time [s]: 19  
Integration End Time [s]: 69  
Slope Threshold: 0.6  
Height Threshold [FU]: 0.5  
Area Threshold: 0.2  
Width Threshold [s]: 0.5  
Baseline Plateau [s]: 6

**Filter Settings**

Filter Width [s]: 0.5  
Polynomial Order: 4

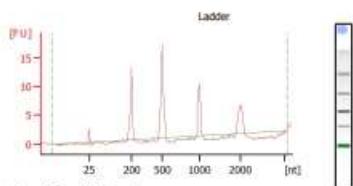
**Ladder**

Ladder Peak	Size
1	25
2	200
3	500
4	1000
5	2000
6	4000



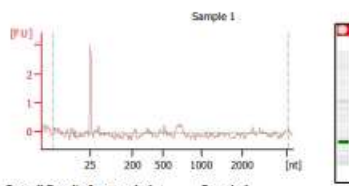
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

**Electropherogram Summary**



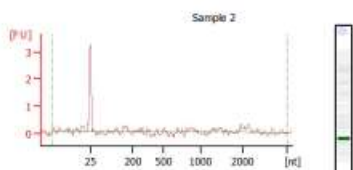
**Overall Results for Ladder**

RNA Area: 61.2  
 RNA Concentration: 150 ng/ul  
 Result Flagging Color: All Other Samples  
 Result Flagging Label:



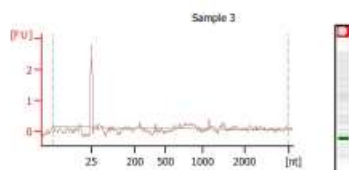
**Overall Results for sample 1 : Sample 1**

RNA Area: 2.8  
 RNA Concentration: 7 ng/ul  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0  
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (0.02.00)  
 Result Flagging Color: RIN N/A  
 Result Flagging Label:



**Overall Results for sample 2 : Sample 2**

RNA Area: 4.8  
 RNA Concentration: 12 ng/ul  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0  
 RNA Integrity Number (RIN): 1.1 (0.02.00)  
 Result Flagging Color: RIN: 1.10  
 Result Flagging Label:



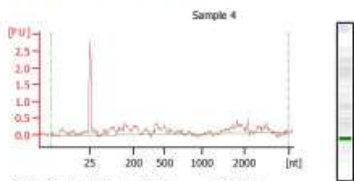
**Overall Results for sample 3 : Sample 3**

RNA Area: 2.4  
 RNA Concentration: 6 ng/ul  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0  
 RNA Integrity Number (RIN): N/A (0.02.00)  
 Result Flagging Color: RIN N/A  
 Result Flagging Label:

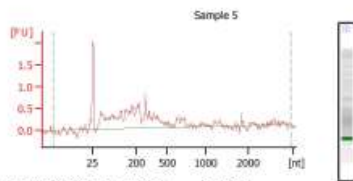
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
 Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

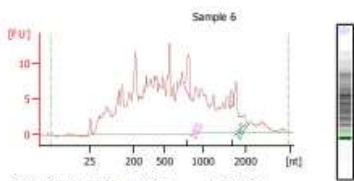
Electropherogram Summary Continued ...



Overall Results for sample 4 : **Sample 4**  
 RNA Area: 10.9  
 RNA Concentration: 27 ng/µl  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0  
 RNA Integrity Number (RIN): 1.4 (0.02.08)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 1.40



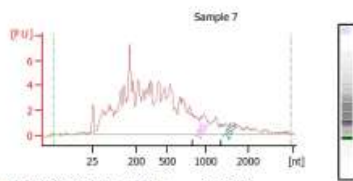
Overall Results for sample 5 : **Sample 5**  
 RNA Area: 14.7  
 RNA Concentration: 36 ng/µl  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0  
 RNA Integrity Number (RIN): 2.4 (0.02.08, Anomaly Threshold(s) manually adapted)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 2.40



Overall Results for sample 6 : **Sample 6**  
 RNA Area: 387.2  
 RNA Concentration: 949 ng/µl  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.2  
 RNA Integrity Number (RIN): 2.8 (0.02.08)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 2.80

Fragment table for sample 6 : **Sample 6**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
185	750	898	8.6	2.2
285	1,032	1,728	1.8	0.5



Overall Results for sample 7 : **Sample 7**  
 RNA Area: 170.5  
 RNA Concentration: 418 ng/µl  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.2  
 RNA Integrity Number (RIN): 2.1 (0.02.08)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 2.30

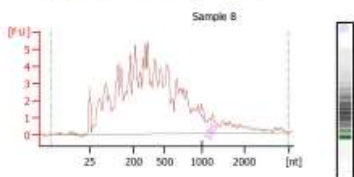
Fragment table for sample 7 : **Sample 7**

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
185	769	894	0.7	0.4
285	1,333	1,389	0.1	0.1

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
 Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

**Electropherogram Summary Continued ...**



**Overall Results for sample 8 :** Sample 8

RNA Area: 167.2  
 RNA Concentration: 410 ng/µl  
 rRNA Ratio (28s / 18s): 0.0  
 RNA Integrity Number (RIN): 2.3 (8.02,38)  
 Result Flagging Color:    
 Result Flagging Label: RIN: 2.30

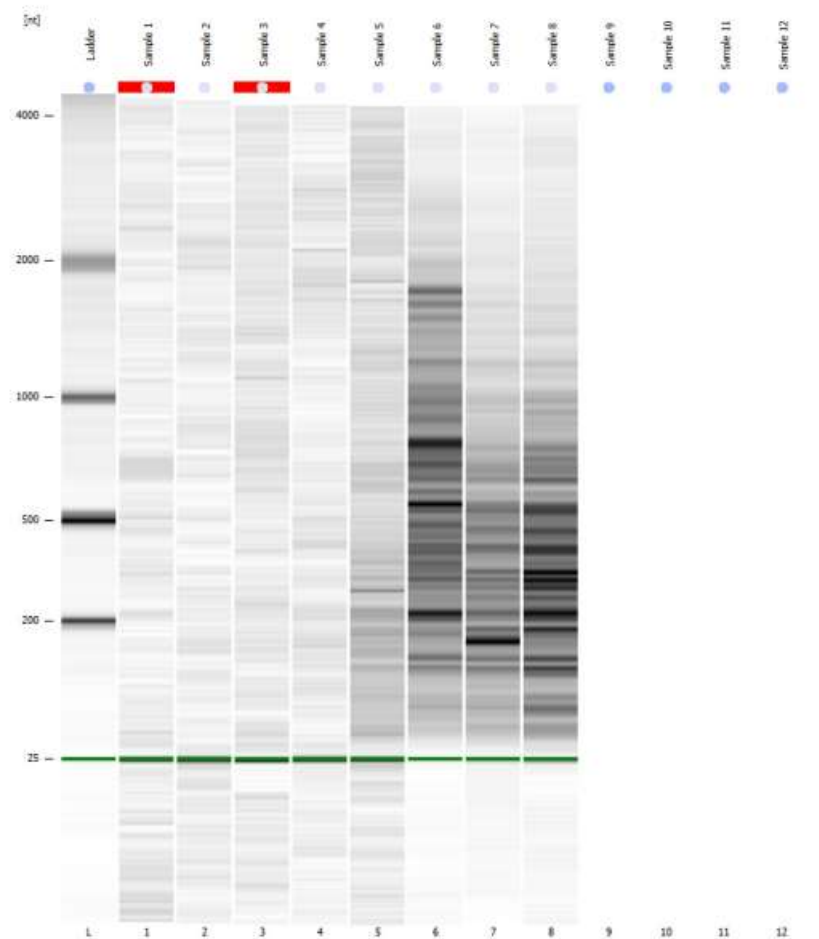
**Fragment table for sample 8 :** Sample 8

Name	Start Size [nt]	End Size [nt]	Area	% of total Area
18S	165	1,078	0.0	0.0

Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

Gel Image



2100 expert\_Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Page 8 of 9

---

Assay Class:	Eukaryote Total RNA Nano	Created:	12/5/2022 1:46:19 PM
Data Path:	C:\...Eukaryote Total RNA Nano_DE13806079_2022-12-05_13-46-20.xad	Modified:	12/5/2022 2:13:07 PM

**Invalid Samples**

Sample 9 has not been run, no results available.

Sample 10 has not been run, no results available.

Sample 11 has not been run, no results available.

Sample 12 has not been run, no results available.

2100 expert\_Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad

Page 9 of 9

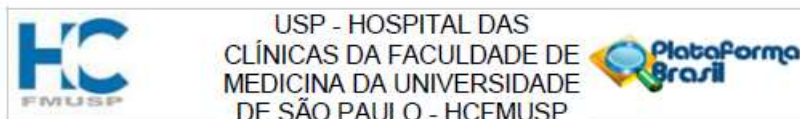
Assay Class: Eukaryote Total RNA Nano  
 Data Path: C:\...Eukaryote Total RNA Nano\_DE13806079\_2022-12-05\_13-46-20.xad  
 Created: 12/5/2022 1:46:19 PM  
 Modified: 12/5/2022 2:13:07 PM

## Run Logbook

Description	Number	Source	Category	Sub Category	Time	Time Zone	User	Host
Run ended on port 1 (Number of wells acquired: 9)		Instrument	Run		12/5/2022 4:04:39 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Run started on port 1 (File: C:\Program Files (x86)\Agilent\2100 bioanalyzer\2100 expert\Data\2022-12-05\2100 expert_Eukaryote Total RNA Nano_DE13806079_2022-12-05_13-46-20.xad)		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Product Number : G2938C		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Name : 2100 bioanalyzer		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Vendor : Agilent Technologies		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Serial# : DE13806079		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Firmware : C.01.069		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP
Cartridge : Electrode		Instrument	Run		12/5/2022 3:46:25 PM	(GMT -02:00) E. South America Standard Time	Admin	LGCM-HP



## Anexo A – Parecer consubstanciado da CEP



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Patogenia do envolvimento do coração na febre amarela: aspectos clínicos, histopatológicos, imunohistoquímicos e de biologia molecular em casos de autópsias realizadas pelo Departamento de Patologia, durante a epidemia de 2018-2019

**Pesquisador:** AMARO NUNES DUARTE NETO

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 38880620.4.0000.0068

**Instituição Proponente:** Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 4.354.375

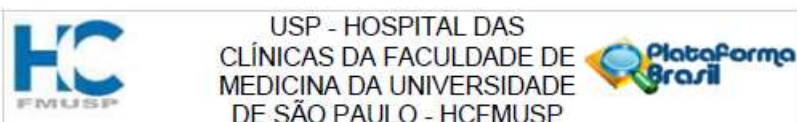
**Apresentação do Projeto:**

O estudo será uma análise retrospectiva, das autópsias de pacientes com FA realizadas no DP-FMUSP no período de 2018-2019. Este estudo será continuidade de estudo amplo, previamente aprovado pelo CEP do HCFMUSP (número do processo: 2.669.963).

A febre amarela (FA) é uma arbovirose hemorrágica, com diferentes apresentações clínicas e variável gravidade. Embora endêmica na Região Amazônica, houve recente surto na Região Sudeste do Brasil, com diversos óbitos no Estado de São Paulo. É uma doença sistêmica que, apesar do tropismo hepático, causa lesões em diversos órgãos, dentre eles o coração. Há alguns estudos em patologia humana e outros experimentais em animais que descreveram padrões de acometimento cardíaco, especialmente hemorragias e edema, porém os dados são escassos e não elucidam com maior profundidade os mecanismos de lesão cardíaca na FA. Diante dessas lacunas no conhecimento e considerando que durante o surto foram realizadas autópsias de 78 casos confirmados de FA pelo Departamento de Patologia, este estudo objetiva determinar e descrever os achados clínicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e anátomo-patológicos do coração dos casos fatais de febre amarela internados no Hospital das Clínicas, durante a epidemia de 2018-2019, bem como determinar a expressão de RNA mensageiro em amostras de tecido cardíaco destes pacientes. O estudo será uma análise retrospectiva dos prontuários e autópsias desses

**Endereço:** Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
**Bairro:** Cerqueira Cesar **CEP:** 05.403-010  
**UF:** SP **Município:** SAO PAULO  
**Telefone:** (11)2661-7585 **Fax:** (11)2661-7585 **E-mail:** cappelq.adm@hc.fm.usp.br





Continuação do Parecer: 4.354.375

pacientes. Serão coletados dados demográficos e clínicos, revisados cortes histológicos do coração, realizados protocolos de imunohistoquímica para diversos antígenos de interesse, análise por microscopia eletrônica de casos selecionados e avaliação de transcriptoma. Os dados coletados serão armazenados em planilhas do Excel e posteriormente analisados com os teste estatísticos pertinentes.

Hipótese:

-O vírus da febre amarela induz miocardite

-A análise por transcriptoma do tecido cardíaco de casos com febre amarela grave, demonstra marcadores de desfecho desfavorável

Critério de Inclusão:

Serão incluídas no estudo autópsias de pacientes, de qualquer faixa etária e com quaisquer outras comorbidades, que tiveram o diagnóstico de FA, de acordo com a definição de caso, determinada pela Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo e Ministério da Saúde, Brasil (anexo 2). Serão incluídos amostras emblocadas de coração de pacientes com dengue, seps e cardiomiopatia hipertensiva como controles, para comparação com os casos de febre amarela, nos estudos por imunohistoquímica e transcriptoma.

Critério de Exclusão:

Serão excluídos casos que não têm diagnóstico de febre amarela

#### Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

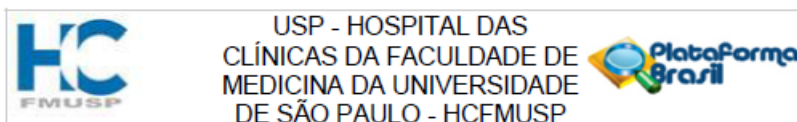
3.1 Determinar e descrever os achados clínicos, eletrocardiográficos, ecocardiográficos e anátomo-patológicos do coração de casos fatais de febre amarela, internados no Hospital das Clínicas, durante a epidemia de 2018-2019.3.1.1 Descrever os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos, eletrocardiográficos e ecocardiográficos dos casos;3.1.2. Descrever os achados macroscópicos do coração desses

pacientes;3.1.3. Analisar os achados histopatológicos encontrados em cortes histológicos dos casos; do coração desses pacientes;3.1.4. Avaliar com técnicas de imunohistoquímica a expressão de imunomarcadores de lesão miocárdica, no tecido cardíaco de tais casos.

Objetivo Secundário:

3.2. Determinar a expressão do RNA mensageiro, em amostras de tecido cardíaco de casos fatais de febre amarela, por meio do transcriptoma.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappesq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.354.375

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

##### **Riscos:**

A pesquisa será executada somente após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa do HC-FMUSP, obedecendo às diretrizes sobre pesquisa em seres humanos.

A autópsia é um procedimento médico. No ICHC-FMUSP há um informe, assinado por responsáveis e familiares do cadáver, para a realização do estudo anatomopatológico (anexo). Como o presente estudo não envolve experimentação direta ou entrevista com pacientes e familiares não necessitará de preenchimento de Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Há risco de quebra de confidencialidade com os dados coletados; para tanto os pesquisadores garantirão o sigilo de todos os casos arrolados no estudo, não divulgando publicamente o nome ou qualquer outra informação que possa identificar os pacientes envolvidos.

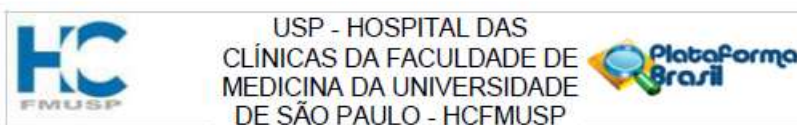
O risco biológico aos pesquisadores será mínimo, haja vista que o material analisado estará em forma de laudos e de material emblocado em parafina, com seus respectivos cortes histológicos em lâminas de vidro.

##### **Benefícios:**

A febre amarela é uma doença com elevada morbi-mortalidade e sua recente epidemia no Estado de São Paulo teve grande impacto no Sistema de Saúde. Dentro de um organograma estabelecido pelo "Comitê de Crise da Febre Amarela", organizado pela Diretoria Clínica do HCFMUSP, o Departamento de Patologia (DAP) teve um papel específico: realizar as autópsias de casos suspeitos ou confirmados de febre amarela. Tratava-se de uma situação inusitada, em que o hospital subitamente foi tomado por casos de hepatite fulminante, com rápida evolução para desfecho letal. Assim, o DAP deu suporte a outros hospitais da rede, sem serviço de autópsia, realizando o exame post mortem de casos suspeitos ou confirmados, encaminhados ao Serviço de Verificação de Óbitos da Capital. A atuação do DAP, através das autópsias, foi decisiva para o melhor entendimento da doença e na escolha de propostas terapêuticas por parte das clínicas envolvidas com o cuidado direto aos pacientes, uma vez que a interação clínica-patologia ocorreu de forma estreita e em tempo imediato após a realização dos exames post mortem. Ao final de maio de 2019, após dois períodos sazonais da febre amarela, foram realizadas no Departamento de Patologia da FMUSP 85 autópsias, sendo 78 casos confirmados e 7 casos excluídos.

Portanto, o vasto material histopatológico obtido e analisado pelo DAP, tem a possibilidade de gerar estudos específicos sobre a patogenia da FA, aplicando metodologias modernas de patologia. Entendemos, pelo que foi exposto acima, que há lacunas e questões no conhecimento da patologia cardíaca na doença, e as amostras das autópsias podem ser bem utilizadas para

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira César CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.354.375

respondê-las adequadamente. A elucidação de mecanismos patogênicos contribui para compreensão do acometimento cardíaco na febre amarela, abrindo espaço para posterior desenvolvimento de estratégias diagnósticas e terapêuticas. A análise por transcriptoma de amostras de tecido cardíaco, coletadas no período post mortem de pacientes com FA fatal, correlacionando-a com parâmetros bioquímicos, com o aspecto morfológico das lesões à microscopia óptica e com o resultado da imunomarcagem de antígenos in situ, por meio de imunohistoquímica, será inovadora na patologia cardíaca de doenças tropicais e permitirá esclarecer processos patogênicos associados.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Estudo bem desenhado com metodologia adequada, objetivos relevantes em relação ao tema proposto.

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

Termos de apresentação obrigatória presentes.

Os pesquisadores solicitam dispensa do TCLE por se tratar de análise retrospectiva das autópsias de pacientes com FA realizadas no DP-FMUSP no período de 2018-2019. O estudo não envolve experimentação direta ou entrevista com pacientes ou familiares e no ICHC-FMUSP há um informe, assinado por responsáveis e familiares do cadáver, para a realização do estudo anatomo-patológico. Nesse informe assinado pelos familiares consta a informação de que um dos objetivos da autópsia é contribuir com informações para programas de saúde pública, ensino e pesquisa científica.

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

Termos de apresentação obrigatória presentes e adequados.

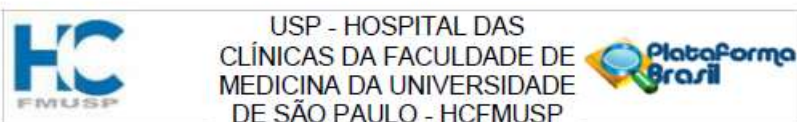
Os pesquisadores ficam dispensados do TCLE.

Sem óbices éticos.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Em conformidade com a Resolução CNS nº 466/12 – cabe ao pesquisador: a) desenvolver o projeto conforme delineado; b) elaborar e apresentar relatórios parciais e final; c) apresentar dados solicitados pelo CEP, a qualquer momento; d) manter em arquivo sob sua guarda, por 5 anos da pesquisa, contendo fichas individuais e todos os demais documentos recomendados pelo CEP; e) encaminhar os resultados para publicação, com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto; f) justificar perante ao CEP interrupção do projeto ou a não publicação dos resultados.

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



Continuação do Parecer: 4.354.375

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1528921.pdf	05/10/2020 14:38:27		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	dispensa_tcle_consideracoes_eticas.pdf	05/10/2020 14:38:11	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito
Outros	declaracaodecustos.pdf	18/09/2020 17:40:01	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito
Outros	anuenciaSVO.pdf	18/09/2020 17:39:28	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito
Cronograma	Cronograma.pdf	18/09/2020 17:38:55	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito
Outros	compromisso.pdf	18/09/2020 17:38:41	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito
Folha de Rosto	FR_AMARO_NUNES.pdf	08/09/2020 15:09:39	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projeto.pdf	18/03/2020 23:46:49	AMARO NUNES DUARTE NETO	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

SAO PAULO, 22 de Outubro de 2020.

Assinado por:  
**ALFREDO JOSE MANSUR**  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Ovídio Pires de Campos, 225 5º andar  
 Bairro: Cerqueira Cesar CEP: 05.403-010  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2661-7585 Fax: (11)2661-7585 E-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br



## ANEXO B – Informe aos familiares para realização de autópsia



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**SERVIÇO DE VERIFICAÇÃO DE ÓBITOS DA CAPITAL**

**INFORME AOS FAMILIARES**

Número / Nome do Falecido  
 VO /

O Serviço de Verificação de Óbitos tem como finalidade executar as autópsias nos casos de morte natural (por doença).

A autópsia (ou necrópsia) é um ato médico que tem os seguintes objetivos:

- 1 - esclarecer ou confirmar a causa de morte sempre que possível, permitindo o preenchimento da Declaração de Óbito;
- 2 - estabelecer qual a doença básica que foi responsável pelo óbito;
- 3 - diagnosticar as demais doenças que eventualmente estejam presentes;
- 4 - reunir as informações obtidas, nas autópsias, para contribuir no estabelecimento de programas de saúde pública, ensino e pesquisa científica, úteis para a população.

A autópsia consiste no exame de cada um dos principais órgãos do corpo. Antes de examinar os órgãos, poderá ser realizado, ocasionalmente, algum exame de imagem (tomografia, ultrassom, raio X ou ressonância) com o objetivo de auxiliar na análise desses órgãos. Como consequência da autópsia, um ou mais órgãos poderão, eventualmente, ficar retidos com os seguintes objetivos:

- a) complementar o exame, numa etapa posterior, para permitir que as conclusões obtidas, através da autópsia, sejam as melhores possíveis;
- b) possibilitar a pesquisa científica naqueles casos em que o estudo trará benefícios para a população em geral e, portanto, também para os parentes e amigos da pessoa autopsiada;
- c) permitir o ensino para que haja uma melhoria cada vez maior do atendimento médico à população (incluindo os familiares e amigos).

Finalmente, esclarecemos que todos os procedimentos utilizados para a realização da autópsia, inclusive aqueles citados acima, são feitos de tal forma que não haja nenhuma mutilação externa, ou seja, o corpo, é liberado para a família devidamente vestido sem apresentar sinal visível de que a autópsia tenha sido realizada.

De acordo, \_\_\_\_\_

## ANEXO C - Ficha de Notificação para FA (SINAN, MS, Brasil), com critérios de definição de caso

República Federativa do Brasil Ministério da Saúde		SINAN SISTEMA DE INFORMAÇÃO DE AGRAVOS DE NOTIFICAÇÃO		Nº		
FICHA DE INVESTIGAÇÃO DE FEBRE AMARELA						
CASO SUSPEITO: Indivíduo com quadro febril aguda (até 7 dias), de início súbito, acompanhado de icterícia e/ou manifestações hemorrágicas, residente ou procedente de área de risco para febre amarela ou de locais com ocorrência de epizootias em primatas não humanos ou isolamento de vírus em vetores, nos últimos 15 dias, não vacinados contra febre amarela ou com estado vacinal ignorado.						
Dados Gerais	1	Tipo de Notificação		2 - Individual		
	2	Agravado/doença		<b>FEBRE AMARELA</b>		
		Código (CID10)	3	Data da Notificação		
		A 9 5.9				
Dados Gerais	4	UF	5	Município de Notificação		
				Código (IBGE)		
	6	Unidade de Saúde (ou outra fonte notificadora)		Código		
			7	Data dos Primeiros Sintomas		
Notificação Individual	8	Nome do Paciente		9	Data de Nascimento	
	10	(ou) Idade	1 - Hora 2 - Dia 3 - Mês 4 - Ano	11	Sexo M - Masculino F - Feminino 1 - Ignorado	
				12	Gestante 1-1º Trimestre 2-2º Trimestre 3-3º Trimestre 4 - Idade gestacional ignorada 5-Não 6- Não se aplica 9-Ignorado	
				13	Raça/Cor 1-Branca 2-Preta 3-Amarela 4-Parda 5-Indígena 9- Ignorado	
	14	Escolaridade 0-Analfabeto 1-1ª a 4ª série incompleta do EF (antigo primário ou 1º grau) 2-4ª série completa do EF (antigo primário ou 1º grau) 3-5ª à 8ª série incompleta do EF (antigo ginásio ou 1º grau) 4-Ensino fundamental completo (antigo ginásio ou 1º grau) 5-Ensino médio incompleto (antigo colegial ou 2º grau) 6-Ensino médio completo (antigo colegial ou 2º grau) 7-Educação superior incompleta 8-Educação superior completa 9-Ignorado 10- Não se aplica				
15	Número do Cartão SUS		16	Nome da mãe		
Dados de Residência	17	UF	18	Município de Residência		
				Código (IBGE)		
				19	Distrito	
	20	Bairro		21	Logradouro (rua, avenida,...)	
					Código	
	22	Número	23	Complemento (apto., casa, ...)	24	Geo campo 1
	25	Geo campo 2		26	Ponto de Referência	
				27	CEP	
28	(DDD) Telefone		29	Zona 1 - Urbana 2 - Rural 3 - Periurbana 9 - Ignorado		
				30	País (se residente fora do Brasil)	