

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ALERGIA E IMUNOPATOLOGIA

MATEUS VAILANT THOMAZELLA

Translocação microbiana e sua associação com a neutrofilia e gravidade em pacientes
com febre amarela

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão
original está disponível na Biblioteca FMUSP

SÃO PAULO

2023

MATEUS VAILANT THOMAZELLA

**Translocação microbiana e sua associação com a neutrofilia e
gravidade em pacientes com febre amarela**

Versão corrigida. Resolução CoPGr6018/11, de 13 de outubro de 2011. A versão original está disponível na Biblioteca FMUSP

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

Programa de Alergia e Imunopatologia

Orientador: Prof. Dr. Esper Georges Kallás

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

Thomazella, Mateus Vailant

Translocação microbiana e sua associação com a neutrofilia e gravidade em pacientes com febre amarela / Mateus Vailant Thomazella. -- São Paulo, 2023.

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

Programa de Alergia e Imunopatologia.

Orientador: Esper Georges Kallás.

Descritores: 1.Febre amarela 2.Mortalidade
3.Neutrófilos 4.Translocação bacteriana 5.Receptores
de lipopolissacarídeos 6.Biomarcadores 7.RNA
ribossômico 16S 8.Sequenciamento de nucleotídeos em
larga escala

USP/FM/DBD-089/23

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho à minha família, amigos e todos
que me apoiaram nesta caminhada

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus, pela constante presença em minha vida, me guiando e dando força nos momentos de maior dificuldade nesta caminhada;

Ao meu orientador, Prof. Dr. Esper Georges Kallás, por confiar em mim como aluno de doutorado e acreditar em meu potencial para contribuir com o grupo em todas as pesquisas desenvolvidas ao longo desses anos;

A Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelo suporte financeiro para execução deste projeto (Processo nº 2019/12243-1) e por acreditar e incentivar a realização deste trabalho confiando a mim uma bolsa de estudos (Processo 2019/13713-1);

Ao Programa de pós-graduação em Alergia e Imunopatologia e sua secretária, Eleni Arruda, por todo suporte oferecido durante esses anos;

A meus pais, Edilson Thomazella e Lucilene Martins Vailant Thomazella, e minha irmã Mariana Vailant Thomazella, por sempre acreditarem em mim, incluindo os momentos em que nem mesmo eu acreditei. Foi graças a vocês que não desisti quando ainda começava a minha graduação e é pelo apoio incondicional de vocês que cheguei nessa etapa. Por tudo isso, meu muito obrigado;

A minha noiva, Bruna Tiaki Tiyo, pelo companheirismo diário, partilhando a vida comigo e me permitindo partilhar a minha. Por me incentivar e dar forças para ser uma pessoa melhor a cada dia. Pela paciência nos dias nebulosos. Por tudo isso, muito obrigado;

Ao pessoal do Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60), do setor de prestação de serviços ao administrativo, jurídico e financeiro, por todo o apoio e suporte na condução deste projeto, desde verificação de banco de amostras até a formalização de orçamentos e aquisição de materiais para realização do projeto. Também, pelos momentos de descontração que tornam o ambiente mais leve e agradável;

Aos amigos do laboratório e pós-graduação, Cássia, Juliana, Priscilla, Carol Argondizo, Mariana, Carol Soares, Andrea, Ederson Xavier, Elizabeth, Issler, Renan, Claudia, Helena, Celina, Luiz, Camila, Paulo, Victoria, Thais, Monica e Anne. Obrigado pelo apoio e por compartilhar bons momentos no dia a dia do laboratório; por me proporcionarem um ambiente diverso, descontraído e leve, facilitando muito o trabalho diário e me permitindo crescer como indivíduo;

Em especial, agradeço a Cassia, Juliana, Priscilla, Carol Argondizo e Mariana. Muito obrigado por estarem junto comigo desde a concepção deste trabalho, nas ideias do que fazer e como fazer, no mutirão para realização dos experimentos e por me trazerem calma nos momentos de ansiedade. Essa tese também é de cada uma de vocês. E, acima de tudo, muito obrigado por terem sido uma família em São Paulo;

Aos amigos do PATRU *Lab (Pathology Advanced Translational Research Unit)*, laboratório que realizei meu estágio na *Emory University*, Atlanta. Obrigado por compartilharem uma das maiores experiências profissionais da minha vida. Agradeço ao Dr. Rafick Pierre Sekaly, por confiar em mim e me dar a oportunidade de ter tamanha experiência. Agradecimentos também à Susan, Adam, Gabriela, Fernanda e Will, Fernanda Coirada, Amanda, Felipe, Carol, Bilal, Enoch, Ashish, Modi, Tamara, Perla, Saswat e Sangeeta, Vivian e Puja; muito obrigado por todo suporte e ensinamentos recebidos durante minha experiência no laboratório;

Aos amigos do *Villa International*, Atlanta, onde morei durante os 6 meses de meu estágio; Inna, Rebecca, Amanda, Thais, Manpreet, Edoardo, Federica, Fernando, David, Grace, Charlotte, Hillawit, Manuel e Anna. Em especial, aos amigos Pradeep, Suha e Amira, por fazerem parte de uma das melhores experiências que tive na minha vida e terem sido minha família nos 6 meses longe do Brasil;

Muito obrigado a meus familiares, avós, tios, tias, primos e agregados, por estarem do meu lado e torcerem por mim em cada uma de minhas conquistas até este momento;

Aos meus amigos, Pedro, Marina, Amanda, Lincoln, Jan, Deborah, Hellen, Sonia, Fernando, Claudinei, Alex, Claudio, Deise, Larissa, Arthur, George e todos os amigos que, ao longo dessa caminhada, compartilharam bons momentos e estiveram presentes de alguma forma;

Aos professores e amigos Dra. Izabel Galhardo Demarchi e Dr. Dennis Bertolini, que me orientaram ao longo da graduação e mestrado e acreditaram no meu potencial de alcançar voos maiores e vir para São Paulo para o doutorado;

Também agradeço a todos que contribuíram, direta ou indiretamente, para a realização deste trabalho. Em especial, agradeço ao Ícaro Castro, por toda ajuda na idealização e condução de uma série de análises que fazem parte desta tese;

Por fim, agradeço a todos que fizeram e fazem parte da minha caminhada até aqui, desde a graduação, mestrado e agora doutorado. Tenham certeza de que por onde passei nesses anos, aprendi um pouco com cada um de vocês. Muito obrigado.

EPÍGRAFE

“A inevitabilidade da mudança é uma constante universal”

Dr. Sheldon Cooper, *The Big Bang Theory*

NORMALIZAÇÃO 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; 2012.

Universidade de São Paulo. Sistema Integrado de Bibliotecas da USP. Diretrizes para apresentação de dissertação e teses da USP: parte IV (Vancouver). Elaborado por Vânia Martins Bueno de Oliveira Funaro, Maria Cláudia Pestana, Maria Cristina Cavarette Dziabas, Eliana Maria Garcia, Maria Fátima dos Santos, Maria Marta Nascimento, Suely Campos Cardoso. 3a ed. rev., ampl. e mod. São Paulo: SIBi/USP, 2016.

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

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS

LISTA DE TABELAS

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACÕES

RESUMO

ABSTRACT

1. INTRODUÇÃO.....	17
1.1. FEBRE AMARELA	17
1.1.1. Aspectos Históricos.....	17
1.1.2. O Vírus da Febre Amarela	18
1.1.3 Epidemiologia e Prevenção.....	20
1.1.4 Aspectos Patogênicos da Doença.....	23
1.1.5 Resposta Imune	24
1.2 NEUTRÓFILOS	26
1.2.1 Características Gerais.....	26
1.2.2 Neutrófilos e seu Papel na Resposta Imune	28
1.2.3 Neutrófilos e Flaviviruses	32
1.3 TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E DOENÇAS INFECCIOSAS	33
1.3.1 Aspectos Gerais do Trato Gastrointestinal e suas Barreiras de Defesa.....	33
1.3.2 Barreiras Sistêmicas: o Eixo Gastro-Hepático e os Marcadores Indiretos de Translocação Microbiana	35
1.3.3 O Gene da Unidade Ribossomal Bacteriana 16S como Marcador Direto da Translocação Microbiana	38
1.3.4 Translocação Microbiana como Fator de Agravamento em Doenças Virais.....	39
2. OBJETIVOS.....	41
2.1. OBJETIVO GERAL	41
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	41
3. MATERIAL E MÉTODOS.....	42
3.1 ASPECTOS ÉTICOS.....	42
3.2 CASUÍSTICA E DESENHO EXPERIMENTAL	42
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS.....	44
3.3.1 Análise da Produção de ROS pelo Método da Dihidrorodamina-123	44
3.3.2 Análise Fenotípica da População de Neutrófilos Periféricos	45
3.3.3 Estratégia de análise	46

3.4 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA.....	47
3.4.1 Ensaios Imunoenzimáticos.....	47
3.4.2 Quantificação do DNA Bacteriano	48
3.4.2.1 Extração dos ácidos nucleicos	48
3.4.2.2 Curva padrão para quantificação	49
3.4.2.3 Validação dos iniciadores e determinação de curva padrão com material puro.....	51
3.4.2.4 Quantificação do DNA bacteriano 16S nas amostras de plasma dos pacientes	54
3.4.3 Sequenciamento do Gene 16S.....	54
3.4.3.1 Análises bioinformáticas	55
3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS.....	56
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	57
4.1 ANÁLISE DESCRITIVA E O IMPACTO DA FRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NO CURSO DA FEBRE AMARELA	57
4.2 ANÁLISE FUNCIONAL E FENOTÍPICA DE NEUTRÓFILOS.....	61
4.3 ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA	64
4.3.1 Marcadores de Translocação Microbiana Apresentaram-se Elevados em Pacientes Infectados pelo YFV e que Evoluíram para Óbito.....	64
4.3.2 Análise do Perfil Microbiano Plasmático nos Pacientes Infectados pelo YFV Selvagem.....	69
4.3.3 Correlação entre Marcadores de Translocação Microbiana, Variáveis Clínicas e Perfil Microbiológico Plasmático dos Pacientes Infectados com o YFV.....	74
4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	76
5. CONCLUSÕES	80
6. ANEXOS	81
7. REFERÊNCIAS	84
APÊNDICES	103

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Organização genômica do YFV e processamento da poliproteína	19
Figura 2. Esquema da ativação celular por LPS bacteriano via TLR-4	30
Figura 3. Taxa de sobrevivência de indivíduos infectados pelo YFV considerando a contagem de neutrófilos	33
Figura 4. Esquema representativo do sistema imune gastrointestinal	34
Figura 5. Esquema do reconhecimento do LPS pelas moléculas LBP e sCD14.....	37
Figura 6. Representação esquemática da coorte e metodologia aplicada.....	43
Figura 7. Estratégia utilizada para determinação da população de granulócitos e mensuração da produção de ROS.....	45
Figura 8. Estratégia utilizada para determinação da população de neutrófilos (CD66b ⁺ /CD11b ⁺ /CD16 ^{high}).....	47
Figura 9. Visualização de fragmento amplificado do gene 16S de <i>E.coli</i> DH5 α após eletroforese em gel de agarose 1%	50
Figura 10. Decaplicata da curva de DNA <i>spiked</i> gerada para quantificação do DNA 16S	54
Figura 11. Valor preditivo da NLR para óbito na infecção pelo YFV	59
Figura 12. Produção de ROS por granulócitos de pacientes infectados pelo YFV	61
Figura 13. Ativação de neutrófilos em pacientes infectados pelo YFV na fase aguda ..	62
Figura 14. Análise de marcadores plasmáticos de translocação microbiana em pacientes infectados com o YF, na fase aguda	65
Figura 15. Análise de marcadores plasmáticos de translocação microbiana em pacientes infectados com o YFV, na fase aguda que sobreviveram e que foram a óbito	66
Figura 16. PCoA obtido pela métrica de Bray-Curtis das amostras, com base no lote de sequenciamento	70
Figura 17. Perfil microbiológico plasmático dos pacientes infectados com YFV na fase aguda e convalescente da infecção.	72
Figura 18. Análise de correlação da α -diversidade com marcadores de translocação microbiana.	75
Figura 19. Esquemática do possível processo imunopatológico relacionado à gravidade na infecção pelo YFV.	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Painel de anticorpos utilizados para marcação de neutrófilos em amostras de sangue total.....	46
Tabela 2 – Condições de termociclagem para amplificação do gene 16S de <i>E.coli</i> DH5 α	50
Tabela 3 – Iniciadores utilizados para quantificação do gene da unidade ribossomal 16S bacteriana.....	51
Tabela 4 – Reação da PCR padronizada para quantificação do gene 16S	53
Tabela 5 – Parâmetros utilizados para termociclagem e amplificação.....	53
Tabela 6 – Características clínico-epidemiológicas dos casos confirmados de febre amarela obtidos nos períodos de janeiro a maio de 2018 e janeiro a abril de 2019	58

LISTA DE SIGLAS E ABREVIACOES

AIDS	<i>Acquired Immunodeficiency Syndrome</i>
ALT	Alanina aminotransferase
AST	Aspartato aminotransferase
ASV	<i>Amplicon Sequence Variant</i>
AUC	<i>Area Under Curve</i>
BCG	<i>Bacillus Calmette-Guérin</i>
C	Capsídeo
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
cDCs	Células dendríticas clássicas ou convencionais
COVID-19	<i>Coronavirus Disease-19</i>
DENV	Vírus da dengue
DEPC	<i>Diethyl pyrocarbonate</i>
DHR	Dihidrorodamina
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i>
EndoCAb	Anticorpos anti-endotoxina
E	Envelope
FA	Febre amarela
FITC	Isotiocianato de fluoresceína
FSC-A	<i>Forward Scatter-Area</i>
GALT	<i>Gut-Associated Lymphoid Tissue</i>
G-CSF	<i>Granulocyte Colony Stimulating Factor</i>
HC-FMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HDL	Lipoproteína de alta densidade
HIV	<i>Human Immunodeficiency Virus</i>
ICAM-1	<i>Intercellular Adhesion Molecule 1</i>
I-FABP	<i>Intestinal Fatty Acid Binding Protein</i>
IHER	Instituto de Infectologia Emílio Ribas
IL	Interleucinas
INF-I	Interferons do tipo I
IRF	<i>Interferon Regulatory Factor</i>
LBP	<i>Lipopolysaccharide Binding Protein</i>
LIM	Laboratório de Investigação Médica
LPS	Lipopolissacarídeo
MD2	<i>Myeloid Differentiation Protein 2</i>
MELD	<i>Model for End-Stage Liver Disease</i>
MFI	Intensidade Mediana de Fluorescência

MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i>
MPO	Mieloperoxidase
NADPH	<i>Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate</i>
NaHCO ₃	Bicarbonato de sódio
NCR	<i>Noncoding region</i>
NET	<i>Neutrophil Extracellular Traps</i>
NH ₄ Cl	Cloreto de amônia
NK	<i>Célula Natural Killer</i>
NLR	<i>Neutrophil-Lymphocyte Ratio</i>
NS	<i>Nonstructural proteins (NS1 a NS5)</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAMP	<i>Pathogen Associated Molecular Patterns</i>
PBS	Tampão fosfato
PCoA	<i>Principal Coordinating Analysis</i>
pDCs	Células dendríticas plasmacitóides
PMA	<i>Phorbol 12-myristate 13-acetate</i>
prM	Precursor de Membrana
PRR	<i>Pattern Recognition Receptors</i>
RDP	<i>Ribosomal Dataset Project</i>
RIG-I	<i>Retinoic acid-inducible gene I</i>
ROC	<i>Receiver Operating Characteristic</i>
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i>
sCD14	CD14 solúvel
SSC-A	<i>Side Scatter-Area</i>
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
TAE	Tris, Acetato, EDTA
TGF- β	<i>Transforming Growth Factor</i>
TGI	Trato gastrointestinal
TLR	<i>Toll-like receptors</i>
TNF	Fator de necrose tumoral
VLDL	Lipoproteínas de muito baixa densidade
YFV	<i>Yellow Fever Virus</i>
ZIKV	Zika vírus

RESUMO

Thomazella MV. Translocação microbiana e sua associação com a neutrofilia e gravidade em pacientes com febre amarela [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia, 2023.

A febre amarela (FA) é uma doença infecciosa de manifestação aguda e amplo espectro clínico, causada pelo vírus da FA (YFV). Entre os anos de 2017 e 2019, um surto de FA silvestre acometeu o estado de São Paulo, com mais de 600 casos e uma taxa de letalidade média de 35%. Pouco se sabe a respeito de fatores relacionados à gravidade da doença, entretanto, foi demonstrado recentemente que a contagem de neutrófilos é um fator independentemente associado a óbito. Adicionalmente, evidências sugerem a associação entre a ocorrência de translocação microbiana e dengue grave. Neste contexto, o objetivo deste estudo foi investigar a ocorrência de translocação microbiana como fator de agravo e sua associação com a neutrofilia observada na infecção aguda pelo YFV. Para tanto, amostras de sangue periférico de pacientes diagnosticados com febre amarela entre os anos de 2018 e 2019 foram coletadas nas fases aguda (momento da admissão hospitalar, n=90) e convalescente (n=16) da infecção. Amostras de sangue de indivíduos recém-vacinados com YF17DD (14 dias após vacinação, n=10) e de doadores não-infectados e sem vacinação recente (n=30) foram utilizadas como grupos controles. Os níveis plasmáticos de marcadores relacionados à translocação microbiana e dano intestinal foram quantificados por meio de ensaios imunoenzimáticos (sCD14, LBP, EndoCAb IgM e I-FABP) ou PCR quantitativa (DNA 16S). O perfil microbiológico plasmático também foi avaliado por meio do sequenciamento do DNA 16S bacteriano. Análises funcional e fenotípica de neutrófilos foram realizadas nas amostras de sangue dos pacientes admitidos em 2019 pela quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS) (técnica de oxidação da Dihidrorodamina-123) e avaliação da expressão dos marcadores de superfície celular CD66b, CD11b, CD16 e CD14 (citometria de fluxo multiparamétrica), respectivamente. Os resultados foram comparados entre os grupos infectados e controles. Os dados obtidos nas amostras da fase aguda da infecção foram analisados considerando-se o desfecho clínico (óbito, n=27; ou sobrevivente, n=63), dados laboratoriais e escore de MELD (Modelo para Doença Hepática Terminal). A contagem de neutrófilos, a razão neutrófilos/linfócitos e o escore de MELD estavam significativamente elevados nos indivíduos que foram a óbito. Baseando-se no desfecho clínico, óbitos apresentaram níveis mais elevados de sCD14, LBP e I-FABP comparados aos sobreviventes e convalescentes. Não foram observadas diferenças significativas na composição microbiológica entre sobreviventes, óbitos e convalescentes; entretanto, uma discreta redução na diversidade bacteriana dos óbitos em comparação com o grupo de sobreviventes. Adicionalmente, a diversidade bacteriana foi negativamente correlacionada com a contagem de neutrófilos e o escore de MELD. Não foram observadas diferenças na produção de ROS entre infectados e controles. O aumento da expressão de CD66b e a diminuição de CD14 foram observados em neutrófilos de indivíduos infectados. Os níveis de sCD14, LBP, 16S e I-FABP estavam significativamente elevados nos indivíduos infectados em fase aguda comparado aos demais grupos controles. Em conjunto, os resultados obtidos sugerem que pacientes com FA que evoluíram para óbito apresentaram maior dano hepático e intestinal, com comprometimento do eixo gastro-hepático e ocorrência de translocação microbiana, caracterizada pela alteração de marcadores relacionados a este processo.

Palavras-chave: Febre amarela. Mortalidade. Neutrófilos. Translocação bacteriana. Receptores de lipopolissacarídeos. Biomarcadores. RNA ribossômico 16S. Sequenciamento de nucleotídeos em larga escala.

ABSTRACT

Thomazella MV. Microbial translocation and its association with high neutrophil count and severity in patients with yellow fever disease [thesis]. São Paulo: Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Pós-graduação em Alergia e Imunopatologia 2023.

Yellow fever (YF) is an infectious disease with acute manifestations and a broad clinical spectrum caused by YF virus (YFV). Between 2017 and 2019, an outbreak of YF occurred in São Paulo, Brazil, with more than 600 cases and a mortality rate of approximately 35%. Little is known about the factors related to disease severity; however, it was recently shown that neutrophil count is independently associated with death. Additionally, evidence suggests an association between microbial translocation and severe dengue. Therefore, this study aimed to investigate the occurrence of microbial translocation and its association with neutrophil count as a factor associated with the severity of sylvatic YFV infection. To achieve these goals, peripheral blood samples were collected from patients diagnosed with yellow fever between 2018 and 2019 during the acute (time of hospital admission, n=90) and convalescent (n=16) phases of infection. Blood samples from individuals recently vaccinated against YF17DD (14 days after vaccination, n=10) and non-infected donors without recent vaccination (n=30) were used as controls. Plasma levels of markers related to microbial translocation and intestinal damage were quantified using immunoenzymatic assays (sCD14, LBP, EndoCAb IgM, and I-FABP) or quantitative PCR (16S DNA). The plasma microbiological profile was also evaluated by sequencing bacterial 16S DNA. Functional and phenotypic analyses of neutrophils were performed on blood samples from patients admitted in 2019 by quantifying the production of reactive oxygen species (ROS) (Dihydrorhodamine-123 oxidation method) and evaluating the expression of cell surface markers CD66b, CD11b, CD16, and CD14 (multiparametric flow cytometry), respectively. Results were compared between the infected and control groups. Data obtained from samples from the acute phase of the infection were analyzed considering the clinical outcome (death, n=27; or survivor, n=63), laboratory data, and the Model for End-stage Liver Disease (MELD) score. The neutrophil count, neutrophil/lymphocyte ratio, and MELD score were significantly elevated in the deceased patients. The levels of sCD14, LBP, 16S rRNA, and I-FABP were significantly elevated in individuals infected in the acute phase compared with those in the other control groups. Based on the clinical outcomes, deceased patients had higher levels of sCD14, LBP, and I-FABP than survivors and convalescents. No significant differences were observed in the microbiological composition between the survivor, deceased, and convalescent groups; however, a slight reduction in bacterial diversity was observed compared with the deceased and survivor groups. Additionally, bacterial diversity was negatively correlated with neutrophil count and MELD score. No differences were observed in the ROS production between the infected and control groups. Increased CD66b expression and decreased CD14 expression have been observed in neutrophils from infected individuals. Taken together, these results suggest that patients with YF disease who died had more liver and intestinal damage, with impairment of the gut-liver axis and the occurrence of microbial translocation, characterized by changes in markers related to this process.

Keywords: Yellow fever. Mortality. Neutrophils. Bacterial translocation. Lipopolysaccharide receptors. Biomarkers. RNA ribosomal 16S. High-throughput nucleotide sequencing.

1. INTRODUÇÃO

1.1. FEBRE AMARELA

1.1.1. Aspectos Históricos

De provável origem no continente africano, a febre amarela (FA) chegou na América por volta do século XVII, possivelmente em decorrência do comércio de escravos, e a primeira epidemia conhecida da doença ocorreu em 1648, em Yucatán, México (1,2). No Brasil, os primeiros relatos da doença ocorreram em 1685, em Recife, Pernambuco (3). Na África, a primeira epidemia reportada ocorreu apenas em 1778, no Senegal (2). Apesar da descoberta da doença e das epidemias reportadas, por mais de 200 anos o entendimento sobre o modo de transmissão e etiologia da FA permaneceram sem grandes avanços. Apenas em 1901, seguindo as ideias dos médicos Carlos Finlay e Henry Carter, Walter Reed demonstrou que a doença era transmitida a um indivíduo pela picada do inseto vetor *Aedes aegypti*, o qual, previamente, havia se alimentado do sangue de um outro indivíduo infectado (4). A partir de então, campanhas de erradicação da doença por meio do combate ao vetor foram conduzidas e, embora bem-sucedidas, a completa erradicação não foi possível devido a descoberta do caráter zoonótico da doença, mantida em um ciclo silvestre entre mosquitos e primatas não-humanos (5–7).

Os achados de Reed representaram um grande avanço na compreensão da doença; entretanto, o desconhecimento acerca do agente etiológico responsável permaneceu por mais 25 anos, até que, em 1927, o vírus foi isolado de um paciente, de nome Asibi, em Kpeve, Gana, graças aos esforços de uma comissão formada para estudar a FA organizada pela Fundação Rockefeller (*Rockefeller Foundation's West African Yellow Fever Commission laboratory*), em especial aos trabalhos conduzidos pelos pesquisadores Adrian Stokes, Johannes Bauer e Paul Hudson (6,8–11). Tal feito permitiu, nos anos seguintes, o desenvolvimento de técnicas para detecção de anticorpos, que contribuíram para estudos soroepidemiológicos e de diagnóstico da doença, além de demonstrar a semelhança antigênica com outros arbovírus (12). Permitiu ainda, por meio de diversas passagens em cultura de células, a geração de uma cepa enfraquecida do vírus, nomeada 17D, que se tornou a base para o desenvolvimento da vacina antiamarílica, utilizada até

os dias atuais (13,14). Em respeito à biologia molecular, uma maior compreensão foi obtida com o sequenciamento do vírus da FA vacinal, em 1985, por Rice e colaboradores e, mais recentemente, com o advento das técnicas moleculares em larga escala, avanços na compreensão genética e imune vem sendo possíveis (15,16).

Apesar dos avanços obtidos na compreensão da doença, em termos de agente etiológico, ciclos de transmissão e prevenção, epidemias da doença ocorreram e ainda ocorrem, principalmente nos continentes africano e americano, fazendo da FA um assunto de grande importância para a ciência e para a saúde pública.

1.1.2. O Vírus da Febre Amarela

O vírus da FA (YFV, do inglês, *Yellow Fever Virus*) é um arbovírus pertencente ao gênero *Flavivirus*, família *Flaviviridae* (17). A denominação da família é por conta do YFV, em que flavi, do latim, significa amarelo (12). Estruturalmente, o vírion maduro é uma partícula esférica, de aproximadamente 50 nm, constituída por um nucleocapsídeo que protege o material genético e por um envelope viral, este último formado por proteínas virais em associação com componentes da bicamada lipídica da membrana plasmática do hospedeiro (18,19).

Com relação à genômica, possui uma única fita de RNA, polaridade positiva, de aproximadamente 11 kb, que codifica para as proteínas estruturais e não estruturais do vírus. Em sua organização, o RNA viral possui duas regiões flangeadoras não codificantes 5' e 3' NCR (*Non-coding Region*) e uma única região aberta de leitura (ORF, do inglês, *Open Reading Frame*), que codifica para uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos (20). Esta proteína é posteriormente clivada nas três proteínas estruturais – Capsídeo (C), precursor de membrana (prM) e Envelope (E) – responsáveis pela estrutura básica do vírus e em sete proteínas não estruturais (NS, do inglês, *Non-Structural*) – NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5 –, as quais participam dos processos de replicação e montagem da partícula viral (20). A Figura 1 traz uma representação esquemática do genoma e da poliproteína viral.

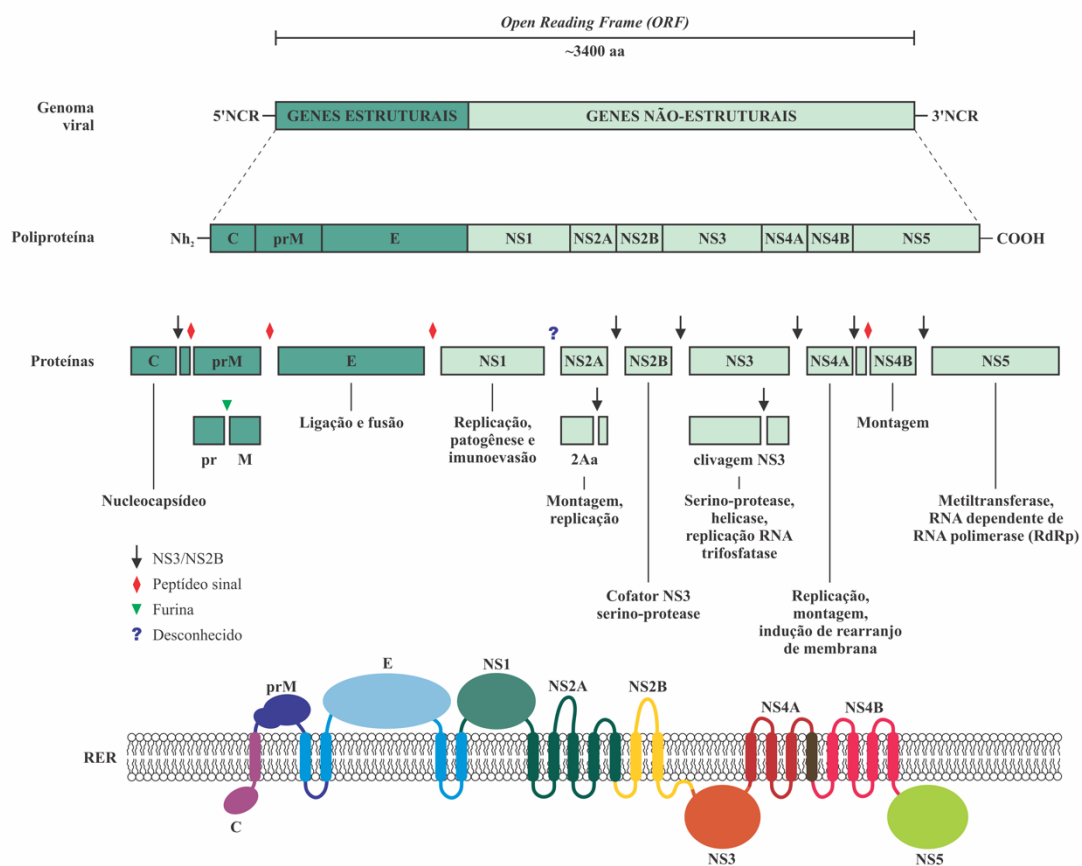


Figura 1. Organização genômica do YFV e processamento da poliproteína

NOTA: O genoma viral (superior) contém uma única ORF, flanqueada pelas regiões 5' e 3' NCR. A ORF é traduzida em uma poliproteína de aproximadamente 3400 aminoácidos, sequencialmente clivada nas proteínas estruturais e não estruturais (C, capsídeo; prM, proteína de membrana; E, envelope) do vírus por dois sistemas principais: peptidases sinais do próprio hospedeiro (losangos vermelhos e triângulo verde) e pela ação da protease viral (NS3, PROT) (setas pretas). A NS5 corresponde a polimerase viral, responsável pela replicação do YFV. O processamento da NS1-2A ocorre por uma enzima do hospedeiro ainda desconhecida (ponto de interrogação). Ao serem expressas, as proteínas virais são integradas à membrana do retículo endoplasmático rugoso (RER), com as proteínas prM, E e NS1 posicionadas para o lúmen e as proteínas C, NS3 e NS5 posicionadas para o lado citoplasmático; as proteínas NS2A e B, NS4A e B são majoritariamente compostas por domínios transmembrana.

Fonte. Adaptado de Lindenbach; Rice, 2003 e Barrows et al., 2018 (20,21).

Durante o ciclo replicativo, as partículas virais interagem com as células do hospedeiro por meio da proteína E, sendo então endocitadas. Após a fusão do vírus com o endossomo, o RNA viral é liberado no citoplasma celular e, em associação ao retículo endoplasmático, traduzido na poliproteína com o auxílio da maquinaria celular da célula hospedeira (18,22). Conforme ilustrado na figura 1, as proteínas virais são clivadas por intermédio de proteínas do hospedeiro e da serino protease NS3, em associação com seu cofator NS2B. Uma vez clivadas, as proteínas não estruturais formam o complexo de

replicação viral. A polimerase (NS5) atua sintetizando uma fita de RNA de polaridade negativa, que serve como molde para a produção de novas fitas de RNA positivas que serão “empacotadas” com proteínas estruturais produzidas, passando por um processo de maturação ao longo do Complexo de Golgi e, por fim, sendo os vírions liberados das células por meio do processo de exocitose, permitindo a infecção de novas células (21,22).

Geneticamente, o YFV pode ser dividido em duas linhagens principais: a africana, composta por 5 genótipos – leste africano, leste/central, oeste I e II e Angola – e a americana, dividida em 2 genótipos, nomeados como sul-americanos I e II, os quais têm ancestralidade comum com as cepas do oeste africano, com a divergência genética ocorrendo por volta do ano 1640 (1,23,24). Em termos de distribuição, o genótipo sul-americano I ocorre de modo predominante no Brasil e em países como Colômbia, Venezuela e Trindade e Tobago. Por sua vez, o genótipo sul-americano II tem ocorrência mais restrita, com predominância em países como Peru e Bolívia, além de ser responsável por casos na região norte do Brasil (25,26).

Por fim, análises de regiões parciais do genoma do YFV evidenciaram que o genótipo sul-americano I divergiu em duas linhagens principais: (i) a antiga, constituída pelo subclado denominado *Old Para* (constituído por cepas isoladas em período anterior a 1968 no Pará) e os subclados 1A, 1B e 1C; e (ii) a moderna, composta pelos subclados 1D e 1E, sendo este último responsável pelos casos mais recentes em diferentes regiões do Brasil (26–28). Apesar da diversidade genética observada, o YFV apresenta apenas um sorotipo e não existem diferenças reportadas na evolução clínica da doença ou na resposta à vacina devido à essa diversidade (17).

1.1.3 Epidemiologia e Prevenção

Com base nos vetores e ciclo de transmissão, a FA pode ser dividida em duas formas principais: a silvestre e a urbana. A FA silvestre ocorre em florestas tropicais na África e América do Sul, compreendendo um ciclo biológico entre diferentes espécies de macacos – entre as quais destaca-se as espécies do gênero *Alouatta* no continente americano, por serem altamente susceptíveis – e mosquitos da família *Culicidae*, sendo mais comuns na África; ou mosquitos *Haemagogus* e *Sabethes*, presentes na América do Sul (29,30). Uma vez que o homem adentre as regiões florestais, pode contrair o vírus

(hospedeiro acidental) e ser a porta de entrada para a ocorrência do ciclo urbano da doença, envolvendo mosquitos da espécie *Aedes aegypti* e o homem.

Na África, após campanhas de vacinação e esforços no combate ao vetor, a FA urbana foi controlada por um período. Entretanto, a partir da década de 1960, um aumento de casos da doença passou a ser reportado em regiões da Etiópia e mais tarde na Nigéria e, entre os anos de 1980 e 2012, mais de 150 surtos da doença, em 26 países africanos, foram reportados à Organização Mundial da Saúde (OMS) (31–33). Entre os anos de 2015 e 2016, duas epidemias de febre amarela urbana ocorreram na República Democrática do Congo e em Angola, com mais de 900 casos confirmados e cerca de 400 óbitos (34). Interessante, um estudo publicado em 2014 estimou a ocorrência anual de aproximadamente 170 mil casos e 60 mil óbitos decorrentes da infecção pelo YFV, além de projetar que 27 países, com cerca de 200 mil pessoas, encontram-se sob risco de epidemias (33). Diante disso, a OMS elaborou a *estratégia para eliminação da febre amarela 2017-2026*, com o objetivo de responder às epidemias urbanas da doença (35).

No Brasil, a última grande epidemia de FA urbana ocorreu em 1929, no Rio de Janeiro, e os últimos casos urbanos da doença foram notificados em 1942, no Acre (29). Desde então, surtos epizooticos da febre amarela têm sido reportados em intervalos de tempo variados nas regiões Norte e Centro-Oeste, onde o vírus circula de forma endêmica (36–38). A partir da década de 1990, entretanto, houve uma expansão das áreas afetadas pela FA silvestre, com casos observados fora da região endêmica (39–41). Neste contexto, com base na circulação do vírus entre primatas não-humanos e a ocorrência de casos em humanos, o Brasil pode ser dividido em duas áreas principais, endêmica e de transição (29,30). O monitoramento e atualização de tais áreas é importante, pois, representa um fator norteador para a determinação de recomendação da vacina pelo Ministério da Saúde (30).

Mais recentemente, entre os anos de 2017 e 2019, um novo surto de FA acometeu o Brasil fora da região endêmica, com mais de 2000 casos confirmados, sendo a região Sudeste a mais afetada (42–44). Segundo dados da Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo, foram mais de 600 casos confirmados da doença neste período, com uma taxa de letalidade de aproximadamente 35% (45,46). Quanto a provável origem, estudo conduzido por Faria e colaboradores (2018), demonstraram que a inserção do vírus possivelmente ocorreu a partir da região endêmica para o estado de Minas Gerais e, sequencialmente para os demais estados.

Com a expansão da FA para além da região endêmica, a recomendação vacinal também sofreu alterações nos últimos anos e, com a epidemia ocorrida entre 2016 e 2018, a dispersão do vírus alcançou a costa leste brasileira, na região de bioma Mata Atlântica, o qual abriga uma ampla diversidade de primatas não-humanos, além de potenciais vetores silvestres (47). Dessa forma, atualmente todo o território brasileiro encontra-se incluído nas áreas de recomendação vacinal, o que evidencia a expansão da FA no país e reforça a necessidade do constante monitoramento e vigilância.

Com relação à vacina, esta é a principal forma de prevenção da FA. Desenvolvida no século XX por Theiler e colaboradores, a vacina antiamarílica 17D consiste em uma vacina de vírus vivo atenuado desenvolvida a partir de múltiplas passagens do vírus selvagem Asibi em cultura celular (48,49). A partir da cepa 17D, outras subcepas foram geradas, entre as quais as subcepas 17DD (produzida e administrada no Brasil) e 17D-204 (48). É uma vacina altamente eficaz, capaz de gerar anticorpos neutralizantes no indivíduo por volta de 10 dias após imunização, com uma eficácia entre 95 e 99%, sendo recomendada a administração em crianças a partir dos 9 meses de idade (30). Até 2013, a OMS recomendava, além de uma dose inicial, doses de reforço a cada 10 anos, entretanto, a partir de 2013, passou-se a recomendar dose única da vacina devido às evidências de manutenção dos níveis de anticorpos neutralizantes (50). É válido ressaltar que para crianças vacinadas contra a FA em idade inferior aos 5 anos, uma dose reforço é recomendada, visto a observação de que crianças vacinadas contra a FA tendem a ter uma redução nos títulos de anticorpos ao longo do tempo (50–54). No Brasil, por exemplo, o calendário nacional de vacinação para FA contempla a primeira dose aos 9 meses de idade, e uma dose reforço aos 4 anos (55).

Apesar de segura, a vacina contra a FA é constituída por um vírus vivo atenuado, o que faz com que algumas precauções e contraindicações sejam estabelecidas, entre as quais: crianças com idade inferior a 6 meses, indivíduos com quadro de imunossupressão grave de qualquer natureza, gestantes e pessoas com histórico de anafilaxia à albumina comprovada, uma vez que o processo de manufatura da vacina envolve o cultivo do vírus atenuado em ovos embrionados de galinhas, ainda que a administração ou não da vacina nestas situações, considerando o cenário epidemiológico da doença no Brasil, possa ser avaliado caso a caso (30,56). Diante das últimas epidemias de FA na África e na América do Sul, devido à elevada demanda de vacinação, a estratégia de administração de uma

dose fracionada foi adotada, uma vez que estudos demonstraram que mesmo uma dose menor da vacina é capaz de induzir a produção de anticorpos neutralizantes (57,58).

Apesar da vacina contra FA ser extremamente eficaz, é fundamental a cobertura vacinal da população para se prevenir de forma efetiva a transmissão do YFV. Neste contexto, é válido ressaltar o trabalho conduzido por Shearer e colaboradores (2017), em que foi levantado a cobertura vacinal da febre amarela entre os anos 1970 e 2016, nos continentes africano e americano (59). Entre os resultados obtidos, os autores observaram que para atingir a cobertura de 80% sugerida pela OMS, considerando as áreas de risco para doença, ainda há um déficit superior a 300 milhões na África e 30 milhões na América. Especificamente relacionado à área de risco no Brasil, ainda seria necessária a vacinação de aproximadamente dois milhões de indivíduos, num cenário otimista (59). Diante disto, iniciativas como a *estratégia para eliminação da febre amarela 2017-2026*, da OMS, são de grande importância para o controle da doença (35).

1.1.4 Aspectos Patogênicos da Doença

A FA é uma doença de manifestação aguda e de amplo espectro clínico, variando de casos assintomáticos ou oligossintomáticos (cerca de 50-60%) até casos graves e fatais (60). Clinicamente, pode ser dividida em três estágios, que incluem infecção, remissão e intoxicação, os quais dependem da evolução e resposta de cada indivíduo.

Em sua forma sintomática clássica, o período de infecção caracteriza-se pelo aparecimento da viremia, acompanhada de febre alta súbita e contínua, dores no corpo, cefaleia e náuseas. A febre pode ainda ser acompanhada de bradicardia, um sintoma denominado como sinal de Faget. Nos casos leves a moderados (cerca de 20 a 30%), os sintomas duram por volta de 4 dias e, na sequência, o indivíduo passa por um período de remissão, com melhora dos sintomas e recuperação completa (30). Entretanto, cerca de 15% dos indivíduos, evoluem para quadros mais graves da doença no período de intoxicação (60). Nesta fase, entre o 5º e 6º dia de sintomas, após passar por um período de melhora sintomática, sintomas mais intensos aparecem, caracterizados pela intensificação da cefaleia e dores musculares, além do aparecimento de vômitos frequentes, icterícia e manifestações hemorrágicas, como epistaxe (sangramento nasal) e hematêmese (presença de sangue no vômito) (30,60). Nesta fase da doença, a taxa de

letalidade é alta, conforme observado na epidemia de FA mais recente que atingiu o estado de São Paulo, com uma taxa de letalidade de aproximadamente 35% (46,61).

No que se refere à patogênese, a FA pode apresentar duas formas principais, neurotrópica e viscerotrópica, sendo a segunda a principal forma de manifestação em humanos e caracterizada pela ocorrência de efeitos sistêmicos observados por meio de análises histopatológicas e alterações laboratoriais (62,63). No curso da doença, é possível observar a ocorrência de leucopenia, devido à redução na contagem de neutrófilos, apesar do aumento relativo da fração linfocitária. Ainda, os níveis das transaminases hepáticas, aspartato aminotransferase (AST) e alanina aminotransferase (ALT), também se encontram elevados (60). Nos casos mais graves, porém, é possível observar uma elevação dos níveis leucocitários, com destaque para os neutrófilos (61,64). Adicionalmente, a elevação das transaminases é mais acentuada e os valores de AST são superiores aos de ALT – possivelmente por conta da injúria dos músculos cardíaco e esquelético causada pelo vírus –, além da elevação dos níveis de bilirrubina, em especial da fração direta, devido aos danos hepáticos (29,60). Ainda, é observada plaquetopenia e redução dos níveis de fatores de coagulação, contribuindo para as manifestações hemorrágicas observadas. O dano renal e a instabilidade hemodinâmica podem ser observados pela elevação dos níveis séricos de ureia, creatinina e redução do íon bicarbonato, o que contribui para quadros de acidose metabólica (60,65).

O diagnóstico da FA é realizado a partir de uma avaliação histórica e confirmado com exames específicos, que envolvem a detecção do vírus (biologia molecular) e/ou pela detecção de anticorpos da classe IgM, que demonstram a ocorrência de doença ativa, a depender do intervalo de tempo decorrente entre o início dos sintomas e realização do diagnóstico (29,30). A aplicação de técnicas imuno-histoquímicas, bem como a realização do isolamento viral também podem ser realizadas, apesar de serem menos utilizadas na prática clínico-laboratorial (30).

1.1.5 Resposta Imune

Uma das primeiras evidências do papel da imunidade inata na infecção pelo YFV decorre de 1945, em um trabalho no qual foi demonstrado que macacos imunizados com a vacina 17D e subsequentemente desafiados com o vírus selvagem entre 1 e 3 dias após imunização, apresentaram-se parcialmente protegidos (66). Desde então, a compreensão

das respostas imunes inata e adaptativa induzidas pelo YFV decorrem, majoritariamente, de estudos realizados utilizando a cepa vacinal do vírus, dada a alta eficácia em gerar imunidade protetora por longos períodos (67). De modo geral, a resposta imune inata consiste na produção de interferons do tipo I (INF-I) e da ação das células *Natural Killer* (NK), ao passo que a resposta adaptativa consiste na produção de anticorpos neutralizantes e desenvolvimento de linfócitos T citotóxicos (68).

As células NK, ativadas por citocinas como INF-I, IL-12 e IL-18, entre outras, atuam promovendo a morte direta das células infectadas, além de produzirem citocinas importantes para a polarização da resposta celular, como por exemplo, o Interferon gama (INF- γ) (68). Estudos anteriores já demonstraram, por exemplo, que o YFV vacinal induz resposta de células NK *in vivo* nos primeiros dias após vacinação, com aumento na expressão de marcadores de ativação e proliferação celular (69,70). Ainda no braço inato da resposta imune, é importante mencionar os monócitos e as células dendríticas, visto o envolvimento destas células como potentes iniciadores de uma resposta inflamatória e desencadeamento de uma resposta adaptativa por meio do processamento e apresentação de antígenos, respectivamente (16,67).

Adicionalmente, com o advento das técnicas de biologia de sistemas, já foi demonstrado que o YFV vacinal induz a expressão de uma rede de genes antivirais relacionados à resposta imune inata, entre os quais podem ser destacados genes relacionados ao reconhecimento de Padrões Moleculares Associados a Patógenos (PAMPs, do inglês, *Pathogen Associated Molecular Patterns*), como por exemplo, TLR7 e RIG-I, receptores de membrana endossomal e citosólico, respectivamente, responsáveis pelo reconhecimento de RNAs fita simples, e os fatores de transcrição IRF7 e STAT1 (71). Neste contexto, o reconhecimento de padrões moleculares como o RNA viral via receptores do tipo Toll (TLRs, do inglês, *Toll-like receptors*) e sensores citoplasmáticos, leva a produção de INF-I e citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para a montagem de uma resposta inflamatória e para a configuração de um estado antiviral, além de contribuir para o desenvolvimento de uma potente resposta adaptativa (16,72).

No que diz respeito à imunidade adaptativa, a vacinação induz resposta humoral, com imunoglobulinas da classe M sendo detectadas cerca de 7 a 10 dias após imunização e a produção de anticorpos neutralizantes persistindo por muitos anos (49,73). Com relação à resposta imune celular, o vírus também induz potentes respostas de linfócitos CD4⁺ e CD8⁺ contra as proteínas do envelope e não estruturais do vírus (49). Conforme

mencionado, o vírus interage com células dendríticas, estimulando a expressão de moléculas do Complexo Principal de Histocompatibilidade (MHC, do inglês, *Major Histocompatibility Complex*) e de moléculas coestimulatórias, que são responsáveis pela apresentação dos antígenos aos linfócitos T nos linfonodos. Este processo é essencial para o desenvolvimento de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ específicos, importantes para a ativação de células da resposta imune citotóxica, geração de anticorpos e produção de citocinas (74). Ainda, células T de memória são detectadas dois a três meses após vacinação e a detecção se mantém por longos períodos (74).

Os aspectos da resposta imune local (hepática) ao vírus selvagem foram discutidos em trabalhos conduzidos por Quaresma e colaboradores (62,75–77). Após a picada do inseto, o vírus é fagocitado por células dendríticas e apresentado nos linfonodos aos linfócitos T CD4⁺, os quais irão coordenar a resposta imune celular. O vírus então se dispersa para diferentes órgãos devido ao tropismo viral e, especificamente no fígado, os hepatócitos e macrófagos teciduais tornam-se infectados e uma predominância de linfócitos T CD4⁺ e CD8⁺ é observada (62). Interessantemente, os pesquisadores observaram que o infiltrado inflamatório hepático não é acentuado e que a apoptose é uma característica bem presente, sendo responsável pelos aspectos clínicos observados na doença (62,75). Mais recentemente, foi demonstrado o possível envolvimento das subpopulações de linfócitos Th17 e Th22, caracterizado pelo aumento de citocinas características dessas células (IL-17, IL-6, TGF-β, IL-22 e IL-13) em cortes histológicos hepáticos de pacientes infectados pelo YFV que foram à óbito, o que poderia contribuir para um aumento ou exacerbação de uma resposta inflamatória, com injúria tecidual mediado pelas citocinas (76,77). Interessantemente, a demonstração do dano hepático, caracterizado pela elevação do MELD score (*Model for End-Stage Liver Disease*), associado a elevada resposta pró-inflamatória, foi recentemente reportada (78).

1.2 NEUTRÓFILOS

1.2.1 Características Gerais

Neutrófilos são células do sistema imune inato envolvidas na resposta inflamatória a agentes infecciosos, principalmente bactérias. São conhecidos como leucócitos polimorfonucleares devido ao aspecto hiper segmentado do núcleo obtido durante o

processo de maturação dessa célula (68). Diariamente, cerca de 10^{11} neutrófilos são produzidos em humanos, fazendo dessas células as mais frequentes dentre os leucócitos circulantes (aproximadamente 60%), com uma vida média de 6 dias (79). Em seu ciclo de vida, os neutrófilos são produzidos na medula óssea por estímulo do Fator de Crescimento de Colônia de Granulócitos (G-CSF, do inglês, Granulocyte colony-stimulating factor) e liberados na circulação, sendo este processo coordenado principalmente pela redução e aumento na expressão dos receptores CXCR4 e CXCR2, respectivamente, em que a redução na afinidade pela quimiocina CXCL12 (expressa por células estromais da medula) permite a saída da medula para a circulação (atraídos pelas quimiocinas CXCL1 e 2) (80,81). Através da circulação, os neutrófilos entram nos diferentes tecidos e, na ausência de estímulo inflamatório, são fagocitados por macrófagos residentes. Esse processo é importante para a manutenção da homeostasia, uma vez que controla os estímulos para produção de neutrófilos na medula (81).

Além disso, os neutrófilos são células pertencentes ao grupo dos granulócitos, pois possuem granações citoplasmáticas, as quais possuem em seu interior uma diversidade de moléculas com diferentes ações efetoras, como por exemplo, enzimas com ação antimicrobiana (82,83). Tais grânulos diferenciam-se dos observados em eosinófilos e basófilos por não se corarem fortemente com corantes ácidos ou básicos (por isso a célula foi nomeada como neutrófilo, de neutro) (68). Os grânulos podem ser divididos em três tipos (primários ou azurofílicos, secundários ou específicos e terciários ou grânulos de gelatinase) e contêm em seu interior diferentes substâncias com funções antimicrobianas (por exemplo, defensinas e lisozima), além de enzimas como a mieloperoxidase (MPO) e elastase, que têm importante papel para funções efetoras dessa célula, como o *burst* oxidativo e formação das *traps* (NET, do inglês, *Neutrophil Extracellular Traps*) (82). Existem ainda vesículas secretoras, estruturas que armazenam moléculas de membrana, como as integrinas, importantes no processo de migração dos neutrófilos (83). No processo de ativação, as vesículas secretoras são as primeiras a serem mobilizadas, seguidas consecutivamente pelos grânulos terciários, secundários e, por fim, primários (82).

1.2.2 Neutrófilos e seu Papel na Resposta Imune

Diante de um desafio antigênico, os neutrófilos são ativados e executam suas funções efetoras por meio de dois mecanismos principais: fagocitose e formação das NETs (83,84). A primeira consiste na internalização do microrganismo em fagossomos, seguida pela mobilização do complexo NADPH (do inglês, *Nicotinamide Adenine Dinucleotide Phosphate*) e da produção de espécies reativas de oxigênio (ROS, do inglês, *Reactive Oxygen Species*) para destruição do microrganismo (83). As NETs, por sua vez, consistem no rompimento da célula, com liberação do DNA associado a enzimas e peptídeos antimicrobianos, lembrando o aspecto de “redes”, as quais atuam capturando e matando os microrganismos (85). O envolvimento das NETs na imunopatogênese e agravo de doenças virais, principalmente do trato respiratório, tem sido relatado (86). É o caso do estudo de Zhu e colaboradores (2018), em que os autores observaram não apenas um aumento na contagem de neutrófilos em casos graves de Influenza A H1N1 como também um aumento nos níveis de MPO associada a DNA, achado sugestivo da formação de NETs. Mais recentemente, a formação das NETs também foi observada na COVID-19 (*Coronavirus Disease-19*), sendo mais evidente em pacientes sob ventilação mecânica, demonstrando o possível envolvimento na imunopatogênese da doença (87).

Apesar de serem células de vida curta e com funções bem definidas na resposta imune inata, os neutrófilos apresentam grande plasticidade, com fenótipos e funções variadas em doenças infecciosas, tumores e até mesmo em condições de homeostase e alterações circadianas (88). A concepção de que os neutrófilos são apenas células da resposta imune inata com função de reconhecer e eliminar patógenos vem sendo substituída por demonstrações do papel mais amplo dessa célula na resposta imune, desde a comunicação e auxílio a outras células da imunidade inata até mesmo à modulação da resposta imune adaptativa (89–91). Um bom exemplo é o recente estudo conduzido por Moorlag e colaboradores (2020), com a demonstração de que a administração da vacina contra a Tuberculose (BCG, do inglês, *Bacillus Calmette-Guérin*) em indivíduos saudáveis induziu um “treinamento imunológico” dos neutrófilos, com alterações celulares a nível genômico e fenotípico de longa duração, além do aumento da expressão de receptores de ativação e migração e das funções antimicrobianas, tornando os neutrófilos mais responsivos a diferentes estímulos microbianos (92).

Em uma perspectiva imunológica geral, as funções celulares são mediadas por interações célula-célula ou célula-ligantes, intermediadas pelo vasto repertório de receptores celulares, localizados na membrana, citoplasma e núcleo das células. Assim, parte da plasticidade funcional dos neutrófilos se deve à quantidade de receptores e, conseqüentemente, vias de ativação e produção de mediadores da resposta imune produzidos e liberados a partir de sua ativação (89,93). Em seu repertório, os neutrófilos possuem receptores de adesinas, integrinas, quimiocinas, citocinas, receptores para as regiões constantes de anticorpos, além dos conhecidos receptores de reconhecimento de padrões (PRRs, do inglês, *Pattern Recognition Receptors*) da imunidade inata, nos quais se incluem os TLRs e os sensores citosólicos, todos capazes de reconhecer diferentes microrganismos por meio dos PAMPs, componentes estruturais ou genômicos expressos unicamente por microrganismos, como por exemplo o LPS bacteriano, ativando os neutrófilos por diferentes vias intracelulares (89,94).

Neste contexto, diante da presença do LPS, o reconhecimento da estrutura bacteriana é realizado via interação com o receptor TLR-4, em associação com outras duas moléculas de superfície, CD14 e MD-2 (*Myeloid differentiation protein 2*), além da participação de uma proteína solúvel com capacidade de se ligar ao LPS, a Proteína Ligadora de LPS (LBP, do inglês, *Lipopolysaccharide Binding Protein*) (figura 2). De forma resumida, o LPS é reconhecido e ligado à LBP; este complexo então liga-se ao CD14 que, por fim, interage com o receptor TLR-4 associado a MD-2 (94,95). Tal interação induz alterações conformacionais do TLR-4, ativando seus domínios intracelulares, permitindo a sinalização via proteína adaptadora MyD88, com posterior ativação do fator de transcrição NF κ B e produção de quimiocinas e citocinas pró-inflamatórias, as quais desempenham, entre outras funções, o recrutamento de mais neutrófilos para o local de inflamação, demonstrando o importante papel dessa célula na resposta inflamatória (89,94,95). Além da sinalização via MyD88, o reconhecimento do LPS pelo TLR-4 induz a internalização do receptor em endossomo, permitindo a sinalização por vias intracelulares que culminam na ativação dos fatores de transcrição IRF3 e 7, com posterior produção de IFN-I, além da degradação do TLR4 e controle da resposta (95).

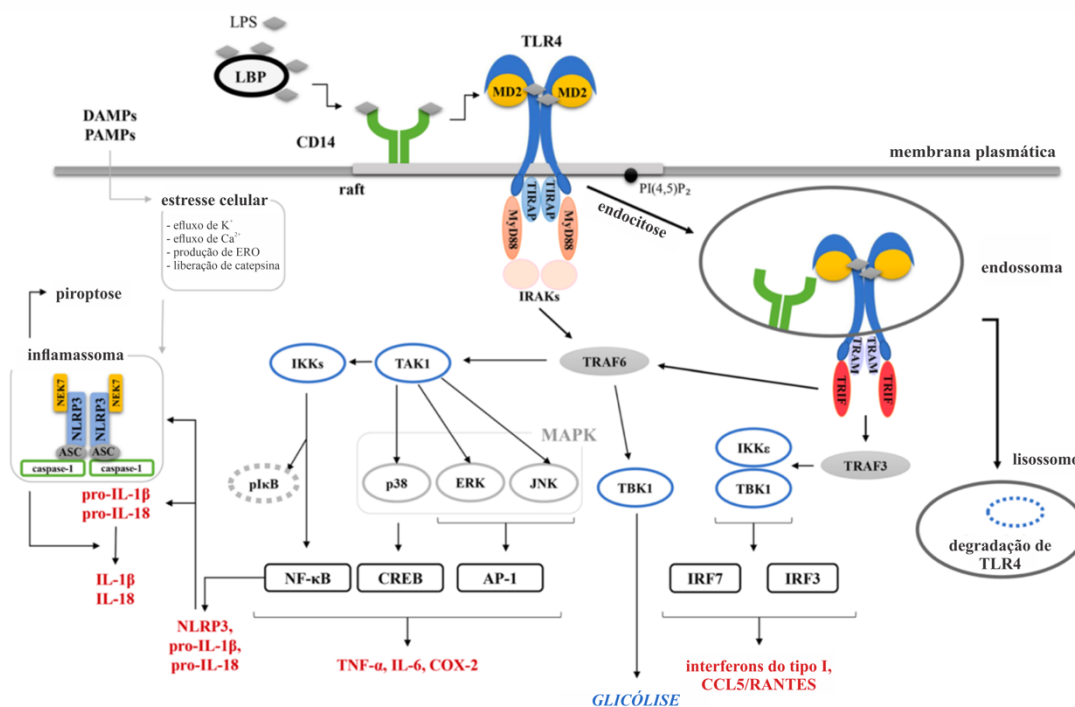


Figura 2. Esquema da ativação celular por LPS bacteriano via TLR-4

NOTA: Inicialmente, a proteína LBP liga-se a agregados de LPS, convertendo-os a monômeros de LPS, os quais serão transferidos para a molécula CD14 e, finalmente, ao complexo TLR-4/MD-2, promovendo alterações conformacionais de TLR-4 e gerando domínios intracelulares para proteínas adaptadoras, entre as quais a MyD88. A partir do recrutamento de MyD88, uma cascata de sinalização é iniciada, com o recrutamento de IRAK4 (*interleukin-1 receptor-associated kinase 4*) o qual atua fosforilando IRAK1 e 2, formando um complexo denominado midossomo. O midossomo, por sua vez, se associa a TRAF6 (*TNF-receptor associated factor-6*), ativando uma proteína quinase de nome TAK1, que tem por função fosforilar a quinase *IκB kinases α/β* (IKKs), convertendo-a ao fator de transcrição NF-κB, o qual, em última instância, induz a produção de uma série de citocinas pró-inflamatórias. Seguindo a ativação dependente de MyD88, ocorre a internalização de TLR4 em vesículas endossomais para posterior degradação e controle da resposta, entretanto, a partir do endossomo recentemente formado, ainda ocorre a ativação de uma outra via intracelular, por intermédio de proteínas adaptadoras TRAM e TRIF, as quais medeiam a ativação de IRF3, resultando na produção de IFN-I.

Fonte: Adaptado de Ciesielska; Matyjek; Kwiatkowska, 2021 (95).

O vasto repertório de receptores dos neutrófilos, bem como suas diferentes atuações na resposta imune, leva a uma diversidade de padrões fenotípicos observados em diferentes situações de saúde e doença, seja para a identificação ou avaliação da ativação destas células (88). Alguns dos marcadores mais comumente utilizados para identificar e avaliar a ativação de neutrófilos em estudos com doenças infecciosas são as moléculas CD66b, CD11b e CD16. Adicionalmente, apesar de ser uma molécula muito utilizada para identificação de monócitos, é válido mencionar o CD14, também expresso por neutrófilos, ainda que em baixa quantidade se comparado aos monócitos, mas que

tem sido utilizado em estudos envolvendo infecções bacterianas, visto o papel dessa molécula na ativação da resposta imune pela interação com o LPS (96–98).

A molécula CD66b, por sua vez, é específica de granulócitos e tem sido amplamente utilizada como marcador de identificação e liberação de grânulos específicos de neutrófilos, com papel na imunopatogênese de doenças infecciosas (99,100). Em estudo conduzido por Pauksens e colaboradores (2008), os autores observaram um aumento da média de intensidade de fluorescência (MFI, do inglês, *Mean Fluorescence Intensity*) de CD66b em pacientes infectados com Influenza A comparado ao grupo controle (101).

Pertencente à família das integrinas, a molécula CD11b (cadeia α M) constitui, em associação à molécula CD18 (cadeia β 2), o antígeno macrofágico 1 (Mac-1), o qual liga-se firmemente a moléculas de ICAM-1 (*Intercellular Adhesion Molecule 1*) no processo de transmigração endotelial dos neutrófilos (93). Um aumento na MFI de CD11b tem sido observado em modelos de endotoxemia, evidenciando o papel desta molécula no processo de ativação de neutrófilos em doenças bacterianas (100,102). Alterações na expressão de CD11b em doenças virais têm sido pouco discutidos (101).

Por fim, a molécula CD16 (FcRIIIB) é um dos receptores da região constante de gamaglobulinas (99). É um receptor de baixa a média afinidade, o qual não possui nenhum domínio transmembrana e se encontra ligado à membrana plasmática por meio de uma âncora lipídica de glicosil-fosfatidil-inositol (GPI, do inglês, *glycosylphosphatidylinositol*). É uma das proteínas de maior expressão na superfície dos neutrófilos, além de ter rápida mobilização para a superfície celular a partir dos compartimentos intracelulares (103). Em condições de homeostase, este receptor atua na remoção de imunocomplexos formados por um processo de endocitose, impedindo que haja ativação de resposta imune com potencial efeito deletério ao organismo (103). Ainda, os níveis de expressão de CD16 variam de acordo com o estado de maturação dos neutrófilos, de modo que neutrófilos maduros, com segmentação nuclear completa apresentam maiores níveis em comparação aos bastonetes, células comumente observadas em quadros de infecções bacterianas (90,102,104).

1.2.3 Neutrófilos e Flaviviroses

O possível envolvimento de neutrófilos na imunopatogênese de arboviroses vem sendo abordado na infecção pelo vírus da dengue (DENV, do inglês, *Dengue Virus*) e, mais recentemente, na FA (64,105,106). Banerjee e colaboradores (2017), evidenciaram um aumento na expressão de genes relacionados à ativação de neutrófilos em casos de dengue grave e dengue com sinais de alarme. O estudo em questão encontrou uma expressão diferenciada nos genes da MPO e da elastase, proteínas envolvidas não apenas na ativação e degranulação dos neutrófilos, como também na formação das NETs. Ainda, os níveis plasmáticos de elastase e MPO aumentaram de acordo com a gravidade da doença e uma relação inversa entre a expressão do gene de elastase e contagem de plaquetas foi observada (106). Adicionalmente, Opasawatchai e colaboradores (2019), observaram um aumento da intensidade média de fluorescência (MFI) de CD66b em pacientes na fase febril da dengue e inferiram que a formação de NETs é um possível fator relacionado à gravidade da doença (105).

Mais recentemente, nosso grupo de pesquisa conduziu um estudo em que foram avaliadas variáveis clínicas e laboratoriais para determinação de fatores preditores de morte na FA (64). Entre os achados, que incluíram a associação de fatores como AST, creatinina e bilirrubina, a contagem de neutrófilos também foi associada à elevada letalidade, sendo uma variável independentemente associada ao desfecho clínico em análise multivariada. O estudo evidenciou que pacientes com uma contagem de neutrófilos igual ou superior a 4000/ μL tiveram uma redução na taxa de sobrevivência quando comparado aos pacientes com contagem inferior a 4000/ μL , considerando o período de 60 dias estabelecido pelo estudo (Figura 3) (64).

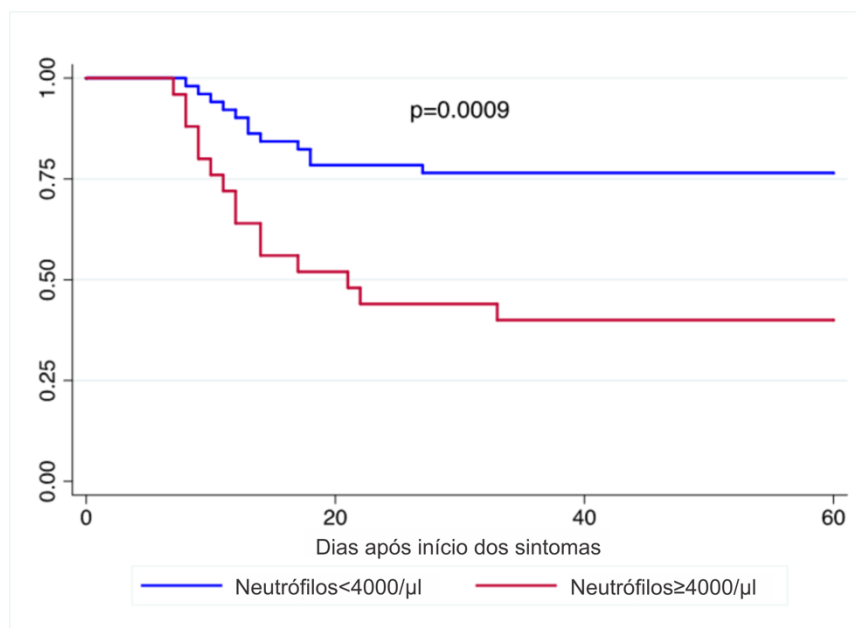


Figura 3. Taxa de sobrevivência de indivíduos infectados pelo YFV considerando a contagem de neutrófilos

NOTA: Indivíduos com contagem superior a 4000 neutrófilos/μL (linha vermelha) tiveram queda significativa na taxa de sobrevivência quando comparado aos indivíduos com contagem inferior a 4000 neutrófilos/μL (linha azul).

Fonte: Kallas et al., 2019 (64).

Uma das explicações discutidas para elevação de neutrófilos e sua associação com mortalidade foi o aumento da resposta inflamatória sistêmica, com a ocorrência de fenômenos como tempestade de citocinas ou a translocação de produtos microbianos provenientes do intestino, um fenômeno previamente observado em uma coorte de pacientes com infecção pelo DENV (107).

1.3 TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA E DOENÇAS INFECCIOSAS

1.3.1 Aspectos Gerais do Trato Gastrointestinal e suas Barreiras de Defesa

O trato gastrointestinal (TGI) é, dentre as superfícies mucosas, a de maior extensão, com uma área total de 400 m², contendo aproximadamente 10¹⁴ microrganismos pertencentes a mais de 2000 espécies, constituindo a microbiota intestinal humana (108,109). Isso faz do TGI um dos principais ambientes de interação entre diferentes antígenos com componentes do sistema imune. A existência da microbiota desempenha relevante função do ponto de vista fisiológico e imunológico,

pois exerce importante papel na indução da produção de imunoglobulinas (principalmente da classe IgA), contribui para a integridade da barreira mucosa devido à metabolização de carboidratos, além de competir com potenciais microrganismos patogênicos (110).

Entretanto, uma vez que essa microbiota saia do compartimento intestinal em direção à circulação sistêmica, pode ser responsável por uma extensa ativação imune e possíveis danos à saúde do indivíduo em decorrência de um processo inflamatório generalizado (110). A essa passagem de microrganismos ou produtos microbianos (LPS, por exemplo) do lúmen intestinal para a circulação sistêmica, dá-se o nome de translocação microbiana (111). Em decorrência dos potenciais danos sistêmicos que podem ser ocasionados pela translocação microbiana, mecanismos de defesa bem estabelecidos atuam de forma conjunta com o objetivo de manutenção da homeostasia. O primeiro deles é próprio lúmen intestinal, a camada de muco, além de defensinas e IgA presentes na região luminal; o segundo composto pelo epitélio intestinal, com sua organização estrutural, e tecido linfóide associado à mucosa; e por fim, barreiras sistêmicas, constituída pelo fígado e moléculas com função de neutralizar produtos translocados (figura 4) (110).

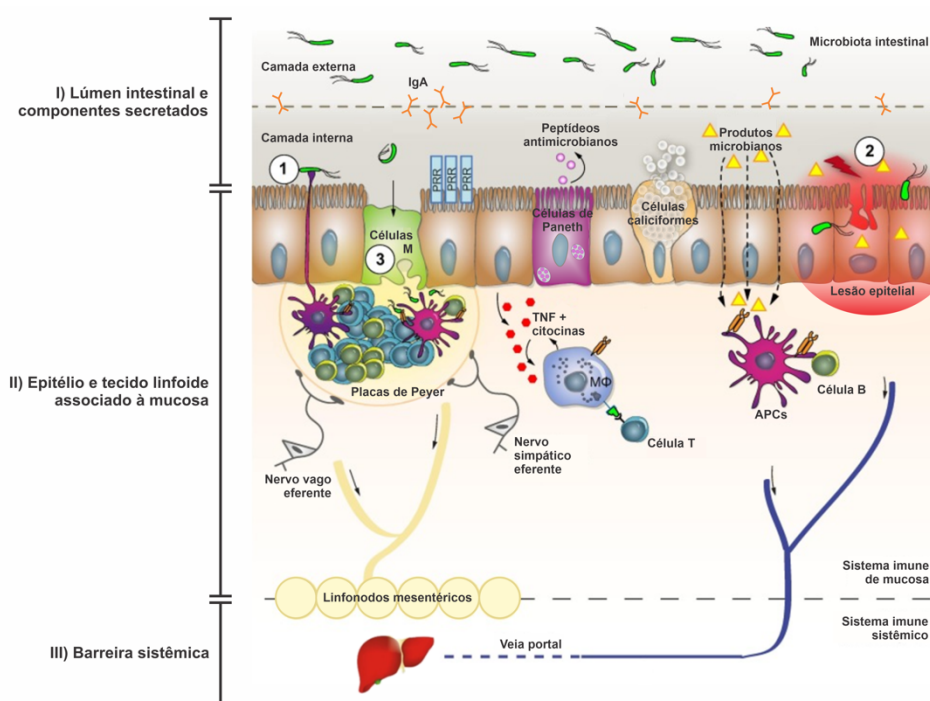


Figura 4. Esquema representativo do sistema imune gastrointestinal

NOTA: Três níveis principais são demonstrados; o lúmen intestinal e componentes secretados (I), basicamente composto pelo muco produzido, peptídeos antimicrobianos e imunoglobulinas; o epitélio intestinal, lâmina própria, células imunes e tecido linfóide associado a mucosa (II); e a terceira barreira,

sistêmica, composta pelo fígado, em que antígenos microbianos que atravessam o epitélio, são drenados pelo sistema portal, no chamado sistema gastro-hepático (III). Os números 1, 2 e 3 representam três rotas de ocorrência de translocação microbiana; 1- captura por projeções de células dendríticas entre as células epiteliais; 2- por meio da injúria no epitélio intestinal e 3- através das células M, especializadas no transporte de antígenos do lúmen direcionado às Placas de Peyer (GALT, do inglês, *Gut-Associated Lymphoid Tissue*). As rotas ilustradas em 1 e 3 consistem em processos fisiológicos, com importante papel na regulação do sistema imune na mucosa gastrointestinal.

Fonte: Adaptado de Wiest, 2014 (112).

1.3.2 Barreiras Sistêmicas: o Eixo Gastro-Hepático e os Marcadores Indiretos de Translocação Microbiana

Além do epitélio intestinal, o fígado constitui importante barreira contra produtos microbianos translocados do intestino, uma vez que a veia porta conecta diretamente fígado e intestino, no denominado eixo gastro-hepático (113) (figura 4). No fígado, o LPS bacteriano ativa diretamente células de Kupffer, as quais exercem suas funções de fagocitose, porém, sem liberação de citocinas pró-inflamatórias, contribuindo para contenção de estímulos infecciosos (110). Por fim, mesmo que antígenos microbianos consigam ultrapassar as barreiras intestinal e hepática, há ainda uma defesa sistêmica, composta por uma série de moléculas que atuam ligando-se e removendo tais antígenos da circulação (110). Neste contexto, o aumento ou redução de tais biomoléculas na circulação tornou-se uma interessante medida em estudos que analisam a ocorrência de translocação microbiana e seu impacto na evolução de diferentes condições patológicas (114–116). Entre os biomarcadores mais utilizados em tais investigações, podem ser destacados:

- CD14 solúvel (sCD14): o CD14 é expresso principalmente em monócitos e macrófagos e é um importante correceptor no processo de ativação da resposta imune pelo LPS bacteriano (110) (figura 5). Diante do desafio antigênico, o CD14 passa a ser secretado em sua forma solúvel (sCD14) e, em associação a LBP, participa do complexo de ligação ao LPS (LPS/LBP/sCD14), potencializando a ligação ao TLR4 e consequente ativação da resposta imune inata (117);
- LBP: é uma proteína de fase aguda produzida pelo fígado, sendo secretada em resposta a processos inflamatórios, ligando-se com alta afinidade ao LPS, participando do complexo LPS/LBP/sCD14 (117,118). Também pode se ligar

a outros antígenos bacterianos, como ácido lipoteicoico e peptidoglicanos, demonstrando um importante papel na resposta imune frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (117);

- Anticorpos anti-endotoxinas (EndoCAb, do inglês, *Endotoxin-core antibodies*): são anticorpos das classes IgM, IgA e IgG naturalmente produzidos (não induzidos por infecção específica) com capacidade de neutralizar e remover o LPS da circulação (110,119). Assim, diante da ocorrência de um processo de translocação microbiana para a circulação, os anticorpos antiendotoxinas ligam-se à porção denominada lipídeo A do LPS, sendo o complexo antígeno-anticorpo removido da circulação via depuração renal, levando a uma redução de seus níveis (111,114,120);
- Proteína Ligadora de Ácidos Graxos Intestinal (I-FABP, do inglês, *Intestinal Fatty Acid Biding Protein*): é um interessante marcador para lesão de enterócitos (121). Conforme mencionado, a translocação microbiana consiste na passagem de produtos microbianos do lúmen intestinal para a circulação. Tal processo ocorre mesmo em indivíduos saudáveis, entretanto, aumenta significativamente diante de um comprometimento da mucosa intestinal (111,122). Assim, a detecção de biomoléculas que permitam avaliar o dano intestinal, como é o caso da I-FABP, são interessantes alvos em estudos de translocação microbiana (111). Por ser expressa exclusivamente em enterócitos, a I-FABP é um interessante marcador em estudos de translocação microbiana, visto sua elevação na circulação em situações de injúria intestinal por morte de enterócitos (111,121).

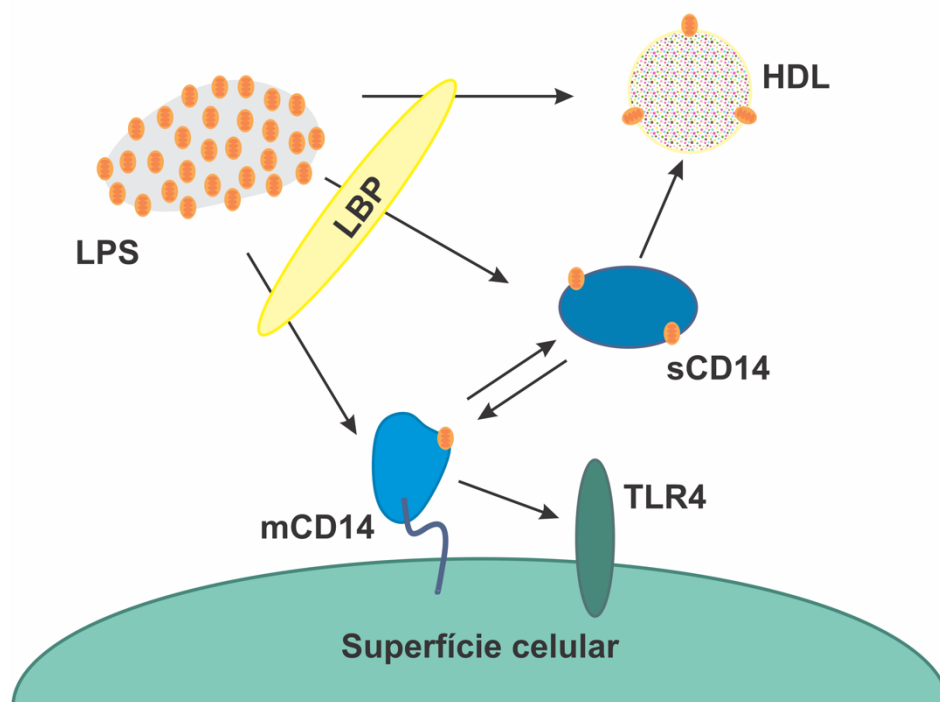


Figura 5. Esquema do reconhecimento do LPS pelas moléculas LBP e sCD14

NOTA: No processo de ativação da resposta imune, o LPS bacteriano liga-se à LBP e, na sequência, ao receptor CD14 expresso na membrana das células (mCD14). O complexo LPS/LBP/mCD14 interage com o TLR-4, levando a ativação da resposta. Alternativamente, o complexo LPS/LBP liga-se à forma solúvel do CD14 (sCD14) podendo levar a ativação da resposta pela interação com TLR-4 ou direcionar o LPS às lipoproteínas de alta densidade (HDL) como forma de atenuação e controle da resposta imune. Por fim, o próprio LBP ao interagir com o LPS, pode direcioná-lo à ligação ao HDL como forma de atenuação da resposta.

Fonte: Adaptado de Kitchens, 2005 (123).

Em decorrência do envolvimento na defesa contra produtos microbianos translocados, sCD14, LBP, EndoCAb e I-FABP são medidas indiretas da translocação microbiana, pois, nenhuma delas constitui parte integrante (estrutural ou genômica) dos microrganismos. Dois bons e bem utilizados exemplos de marcadores diretos para a translocação microbiana são o LPS e o gene da unidade ribossomal bacteriana 16S (16S rRNA), o primeiro constituinte da membrana externa de bactérias Gram-negativas e o segundo, um gene bem conservado e compartilhado por bactérias de diferentes espécies (124,125).

1.3.3 O Gene da Unidade Ribossomal Bacteriana 16S como Marcador Direto da Translocação Microbiana

Conforme mencionado, por ser molécula constituinte da estrutura de bactérias, o LPS é uma biomolécula utilizada como marcador direto em estudos que avaliam a ocorrência de translocação microbiana. Entretanto, apesar de bem utilizado em tais estudos, a quantificação do LPS está sujeita a uma série de variações metodológicas e biológicas, por exemplo, a ocorrência de resultados falso-positivos devido à presença, em amostras de sangue e/ou hemocomponentes, de estruturas de outros microrganismos (β -glicanos de parede celular fúngica, por exemplo) ou até mesmo amostras com elevados teores de triglicerídeos e lipoproteínas de muito baixa densidade (colesterol VLDL) (111,126,127). Neste contexto, a quantificação do 16S rRNA (a partir daqui referido apenas como gene 16S) torna-se uma boa alternativa para uso como marcador direto da translocação microbiana, uma vez que é um gene compartilhado por bactérias Gram-negativas e positivas, além de oferecer menos variações metodológicas e biológicas, ainda que a contaminação de reagentes utilizados em biologia molecular com 16S constitua potencial limitação para este marcador (124,125,128).

Adicionalmente, com o constante avanço das técnicas moleculares dos últimos anos, a identificação de patógenos por meio da aplicação das técnicas “ômicas” (ex: metagenômica, metatranscriptômica etc.) vem ganhando importância no campo da pesquisa clínica, seja por meio de marcadores específicos (com a amplificação de um gene pela PCR seguida por sequenciamento) ou pelo sequenciamento direto do material genético extraído (sequenciamento *shotgun*) (129–132). A partir da aplicação de tais metodologias, tornou-se possível não apenas identificar perfis de comunidade microbiana no contexto saúde-doença, como também associá-los a diferentes condições e/ou desfechos clínicos (133–135).

Neste contexto, um dos marcadores mais conhecidos e utilizados para a determinação do perfil microbiológico é o gene 16S, amplamente utilizado em estudos taxonômicos bacterianos, permitindo determinar, por meio da composição genética, a comunidade bacteriana presente em determinada matriz biológica (microbioma) (136,137). Constituído por aproximadamente 1500 pares de bases, o gene 16S é dividido em 9 regiões variáveis (denominadas V1 a V9), que permitem a diferenciação das bactérias nos diferentes níveis taxonômicos, as quais são espaçadas por regiões constantes

(úteis para desenvolvimento de iniciadores para PCR) (129,138). Utilizando o gene 16S como ferramenta taxonômica, uma série de estudos para avaliar o microbioma em diferentes ambientes no organismo humano (ex: microbioma bucal, intestinal, vaginal etc.) em condição saudável e de doença vêm sendo realizados (134–136,139). Neste sentido, a utilização das métricas de α - e β -diversidade são importantes ferramentas no estudo da diversidade microbiana; a primeira por permitir avaliar a riqueza, abundância e o balanço do microbioma dentro de cada amostra individualmente (análise intra-amostra); e a segunda por permitir avaliar a composição microbiana geral entre diferentes ambientes ou condições, como por exemplo, saudável e doença (análise inter-indivíduos) (129,140).

Além da avaliação do microbioma em compartimentos que possuem contato com o meio externo (TGI, mucosa vaginal, respiratória etc.), a possível existência de um microbioma sistêmico em condições saudáveis tem sido abordada em diferentes estudos (141–143). Entre as possíveis explicações para tal existência está a translocação de bactérias e seus produtos de compartimentos como o intestino para a circulação sistêmica (141). Neste contexto, o perfil microbiológico sistêmico e seu impacto como fator complicador em condições patológicas vêm sendo estudado (134,144). Diante disso, novas abordagens de análise vêm sendo utilizadas, como por exemplo, a identificação de microrganismos a partir da análise de sequências de RNA não alinhadas com o genoma humano em estudos transcriptômicos, o que permite identificar não apenas bactérias, como também outros microrganismos (78,145,146). Neste sentido, a determinação do perfil microbiológico pela análise do gene 16S bacteriano torna-se uma interessante ferramenta na investigação de uma possível translocação microbiana como fator de agravo na infecção aguda pelo YFV.

1.3.4 Translocação Microbiana como Fator de Agravo em Doenças Virais

Apesar de todas as barreiras e mecanismos existentes, a translocação microbiana ainda é um fenômeno observado não apenas em doenças do TGI, mas também no curso de doenças infecciosas, sendo bem estudada na infecção pelo Vírus da Imunodeficiência Humana (HIV, do inglês, *Human Immunodeficiency Virus*) (114). Em um dos primeiros estudos sobre o tema, foi observado o aumento de LPS circulante em indivíduos cronicamente infectados com o HIV, além da redução dos níveis de EndoCAB e elevação

de LBP e sCD14, sendo este um dos primeiros trabalhos a discutir a translocação microbiana como causa da ativação imune sistêmica na infecção pelo HIV (114). Adicionalmente, em outro estudo, foi evidenciada uma correlação entre os níveis de sCD14 e I-FABP, além deste último ter sido observado preditor de morte em pacientes cronicamente infectados com o HIV (147).

A ocorrência de translocação microbiana também tem sido discutida na infecção por arbovírus (107,148). Em estudos conduzidos por van de Weg e colaboradores (2012 e 2013), os autores demonstraram a elevação dos níveis de LPS plasmático na infecção pelo DENV, sendo mais acentuado conforme a gravidade da doença (107,148). Ainda, a elevação de LBP e sCD14 também foi observada, principalmente naqueles com um perfil pró-inflamatório mais acentuado (107).

Até o presente momento, não há estudos que tenham investigado o agravamento da FA em decorrência da translocação microbiana. Assim, considerando a semelhança nos cursos clínicos da dengue e da febre amarela, além da significativa associação entre neutrófilos e óbitos na infecção pelo YFV observada por Kallas e colaboradores (2019), a investigação da translocação microbiana em pacientes infectados pelo YFV selvagem é um importante objeto de estudo, com potenciais contribuições para o melhor entendimento do curso clínico e evolução desta doença, além da possibilidade de contribuir para novas abordagens clínicas no curso da infecção.

2. OBJETIVOS

2.1. OBJETIVO GERAL

Comparar a translocação microbiana e sua associação com a neutrofilia nos pacientes infectados com o YFV selvagem durante a fase aguda da doença, conforme desfecho clínico (sobreviventes e óbitos).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Caracterizar a população de neutrófilos quanto ao fenótipo e produção de ROS na fase aguda nos pacientes infectados pelo YFV selvagem;
- Determinar a presença e quantificar biomarcadores de quebra de barreira intestinal no plasma dos pacientes infectados pelo YFV selvagem;
- Determinar a presença e quantificar biomarcadores de translocação bacteriana no plasma dos pacientes infectados pelo YFV selvagem;
- Quantificar o gene da unidade ribossomal 16S no plasma dos pacientes infectados pelo YFV selvagem;
- Determinar o perfil microbiano plasmático dos pacientes infectados pelo YFV selvagem;
- Avaliar a associação entre as variáveis testadas e o desfecho clínico (sobrevivência ou óbito) dos pacientes.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ASPECTOS ÉTICOS

As amostras biológicas utilizadas neste estudo fazem parte dos projetos de pesquisa intitulados “Arboviroses no contexto da imunotativação crônica pelo HIV” (CAPEPesq n° 15477; CAAE n° 59542216.3.1001.0068) e “Avaliação da segurança e imunogenicidade de diferentes doses da vacina contra Febre Amarela 17DD em populações especiais” (CAPPesq: 0206/10; CAAE n° 83631318.000.068), ambos desenvolvidos pelo grupo de pesquisa do Laboratório de Investigação Médica 60 (LIM-60). Este projeto foi aprovado pela Comissão de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HC-FMUSP), cadastrado e aprovado junto à Plataforma Brasil (CAAE n° 06704819.8.0000.0068, parecer de número 3.190.194) (Anexo A).

3.2 CASUÍSTICA E DESENHO EXPERIMENTAL

Este estudo consistiu em uma coorte retrospectiva, com análises transversal e longitudinal. Como critério de seleção, foram considerados pacientes maiores de 18 anos que deram entrada nos serviços de emergência do HC-FMUSP e do Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER) com suspeita de infecção pelo YFV. Os indivíduos foram selecionados a partir de duas ondas da infecção pelo YFV: a primeira no período de janeiro a maio de 2018 e a segunda entre janeiro e abril de 2019 (figura 6). Para os indivíduos que aceitaram participar do estudo por meio da assinatura do termo de consentimento, amostras de sangue foram coletadas. A confirmação diagnóstica da doença se deu por meio técnicas moleculares (PCR qualitativa ou quantitativa) ou sorológicas (positividade para IgM).

Para este estudo, foram considerados critérios de inclusão pacientes com diagnóstico confirmado de FA (detecção de genoma viral e/ou sorologia) e disponibilidade de amostra de plasma da fase aguda da doença (até 15 dias após início de sintomas). Foram priorizadas as amostras obtidas no momento da admissão hospitalar, sendo consideradas as amostras de seguimento apenas dos casos em que não havia amostras da admissão disponíveis (Apêndice A). Indivíduos com amostras de plasma disponível apenas da fase de convalescença (30 dias ou mais de sintomas) ou sem

amostras disponíveis para análise foram excluídos deste estudo. Também foram excluídos pacientes que foram submetidos a procedimento de troca plasmática (plasmaférese) em data anterior à data de coleta (Apêndice B). Todos os pacientes selecionados para análise foram agrupados com base no desfecho clínico – óbito ou sobrevivente – determinado após o período de acompanhamento definido (60 dias).

Amostras de plasma de 16 pacientes coletadas após 30 dias de sintomas (fase de convalescença ou recuperação) também foram avaliadas. Como grupos controles foram utilizadas amostras de indivíduos vacinados contra febre amarela (coletadas 14 dias após vacinação, n = 10) e amostras de indivíduos não infectados e sem vacinação recente (n = 30).

A figura 6 traz uma representação esquemática dos pacientes selecionados para este estudo nos dois períodos (2018 e 2019) bem como uma esquematização geral do desenho experimental realizado.

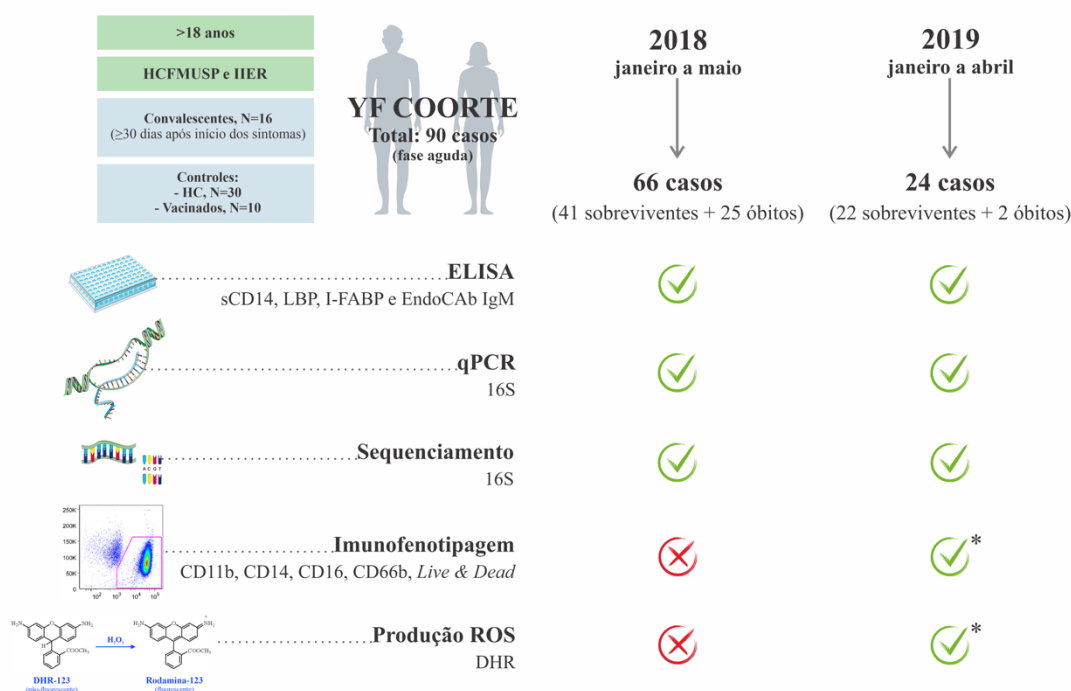


Figura 6. Representação esquemática da coorte e metodologia aplicada

NOTA: Foram incluídos neste estudo pacientes com diagnóstico confirmado de febre amarela durante os dois períodos de surto da doença: entre janeiro e maio de 2018, e entre janeiro e abril de 2019. Foram incluídos pacientes maiores de 18 anos, confirmadamente positivos e na fase aguda da doença, admitidos em dois hospitais referência do estado de São Paulo: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) e Instituto de Infectologia Emílio Ribas (IIER). As amostras de plasma foram submetidas aos imunoenaios e técnicas moleculares. HC = indivíduos não infectados e sem

vacinação recente; *imunofenotipagem e avaliação da produção de ROS foi realizada apenas em 11 pacientes recrutados no ano de 2019.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE NEUTRÓFILOS

Como já descrito, em estudo anterior conduzido pelo nosso grupo de pesquisa, a contagem de neutrófilos periféricos no momento da admissão dos pacientes foi considerada um fator associado a mau prognóstico no curso da FA (64). Dessa forma, propôs-se fazer a caracterização dos neutrófilos periféricos dos casos de 2019 que ainda estavam sendo admitidos, quanto ao *burst* oxidativo e expressão de proteínas de superfície (fenótipo), visto que é um ensaio realizado preferencialmente com amostras a fresco e que, para os pacientes incluídos no ano de 2018, não havia amostra biológica para análise da fração de neutrófilos, além do fato que é um ensaio realizado preferencialmente com amostras de sangue total fresco.

3.3.1 Análise da Produção de ROS pelo Método da Dihidrorodamina-123

Para a avaliação do *burst* oxidativo, foi utilizada a técnica baseada na oxidação da Dihidrorodamina-123 (DHR-123) (não fluorescente) ao composto Rodamina-123 (fluorescente) (ensaio a partir deste ponto nomeado como DHR). Todos os ensaios de DHR foram realizados no mesmo dia em que a coleta do material foi realizada. Para tanto, amostras de sangue total contendo heparina foram coletadas de 11 pacientes no momento da admissão hospitalar. Para esta análise também foram utilizadas amostras de sangue total fresco de 8 indivíduos não infectados e sem vacinação recente (grupo controle).

Resumidamente, 1 mL de sangue foi utilizado para lise de hemácias a 37°C por 5 minutos (9 mL de solução de lise: cloreto de amônia (NH₄Cl) 8,3 g/L; bicarbonato de sódio (NaHCO₃) 1,7 g/L e ácido etilenodiamino tetra-acético (EDTA) 0,3 g/L) seguido por centrifugação a 600 g por 5 minutos. Após este processo, o sobrenadante foi descartado e o botão de células ressuspensionado em 10 mL de tampão fosfato (PBS) para lavagem, sendo novamente centrifugado a 600 g por 5 minutos (processo repetido 2 vezes). Após lavagem, 2 mL de solução de Hanks (Gibco) foram adicionados aos tubos para ressuspensão do botão de células. Para cada amostra, dois tubos de poliestireno (12x75 mm, Falcon) foram identificados como “Estimulado” e “Não estimulado” e 400

μL da solução ressuspensa foi adicionada em cada tubo. Sequencialmente, em cada tubo foi adicionado 5 μL de Catalase 100 U/ μL (Sigma-Aldrich) e 1,8 μL de solução de DHR 10 mg/mL (Sigma-Aldrich).

Após homogeneizar, os tubos foram incubados por 5 minutos em banho-maria a 37 °C e, após este tempo, sem remover do banho-maria, 100 μL de solução de Hanks foram adicionados aos tubos “Não estimulado” e 100 μL de *Phorbol 12-Myristate 13-Acetate* (PMA) 2 ng/ μL (Sigma-Aldrich) foram acrescentados aos tubos “Estimulados”. Após 15 minutos de incubação a 37 °C em banho-maria, os tubos foram removidos, incubados em gelo para bloqueio da reação e imediatamente adquiridos em citômetro de fluxo BD FACS Canto II, utilizando os parâmetros SSC-A e FSC-A para criação do *gate* de granulócitos (aquisição de 100.000 eventos) e o fluorocromo FITC para a oxidação do DHR (figura 7).

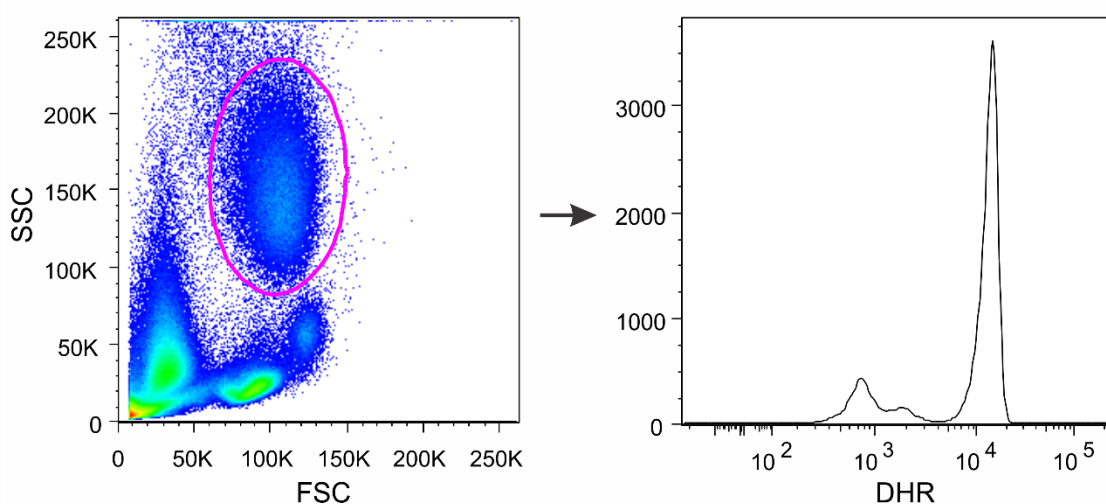


Figura 7. Estratégia utilizada para determinação da população de granulócitos e mensuração da produção de ROS

NOTA: A partir do *gate* de granulócitos (gráfico à esquerda) foi mensurado a produção de ROS pela oxidação do DHR-123 a Rodamina-123, utilizando o canal FITC (gráfico à direita).

3.3.2 Análise Fenotípica da População de Neutrófilos Periféricos

Para a análise fenotípica dos neutrófilos foram utilizadas amostras de sangue total contendo heparina coletadas de 11 pacientes no momento da admissão nos hospitais. Em suma, 100 μL da amostra de sangue total e 100 μL do coquetel de anticorpos específicos (tabela 1) foram incubados por 20 minutos a 4°C, protegidos da luz para marcação. Após esse tempo, as células vermelhas foram lisadas incubando-as em solução de lise (*Lysis*

Solution, 1:10) por 10 minutos a temperatura ambiente e protegidas da luz. Após esse tempo, as células foram centrifugadas a 600 g por 5 minutos e o sobrenadante desprezado. Em seguida as células foram lavadas duas vezes pela adição de 4 mL de solução tampão MACS (PBS 1X, BSA 0,5%, EDTA 2mM) seguida de centrifugação a 600 g por 5 minutos. Ao final, as células foram ressuspensas com 300 µL de PBS 1X e adquiridas em citômetro de fluxo BD FACS Canto II, após compensação automática com *beads* magnéticas (BD Pharmigen).

Tabela 1 – Painel de anticorpos utilizados para marcação de neutrófilos em amostras de sangue total

Marcador	Fluorocromo	Clone	Empresa
LIVE/DEAD*	-	-	Invitrogen
CD66b	FITC	G10G5	BioLegend
CD11b	APC-Cy7	ICRF44	BioLegend
CD16	Alexa700	3G8	BD Pharmigen
CD14	PE	MEM-18	ExBio

* LIVE/DEAD™ Fixable Red Dead Cell Stain Kit, para excitação em 488 nm, Invitrogen

3.3.3 Estratégia de análise

A análise dos resultados foi realizada no software FlowJo 9.9.6. A estratégia básica utilizada está representada na figura 8. Os *gates* de *Time* e *Singlets* foram utilizados como controle de qualidade, a fim de evitar contagens realizadas dentro de uma quebra de tempo e para excluir contagem de eventos duplicados (*doublets*), respectivamente. Foram selecionadas então as células vivas e a partir dessa população, foi separada a população de granulócitos, utilizando os marcadores CD66b e CD11b, de acordo com estudos prévios (100,105). Da população de granulócitos CD66b⁺/CD11b⁺, os neutrófilos foram separados utilizando o marcador CD16, uma vez que eles apresentam alta expressão de CD16 enquanto eosinófilos apresentam baixa expressão. Dentro da população de neutrófilos (CD66b⁺/CD11b⁺/CD16^{high}), a MFI de cada um dos marcadores CD66b, CD11b, CD16 e CD14 foi obtida a fim de comparar os níveis de expressão nos pacientes e controles.

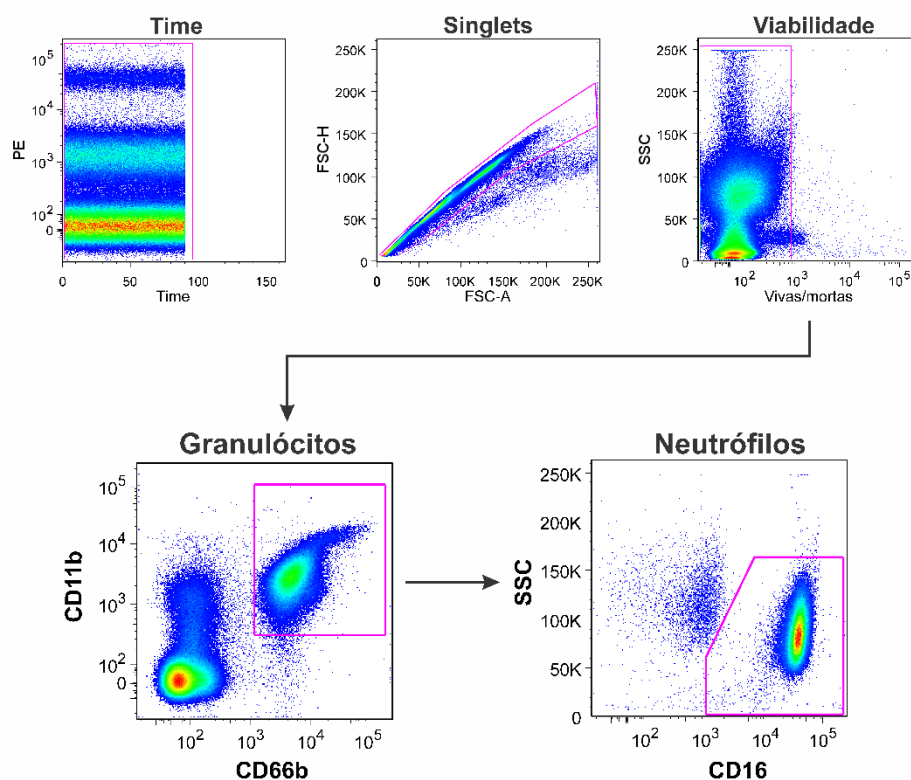


Figura 8. Estratégia utilizada para determinação da população de neutrófilos ($CD66b^+/CD11b^+/CD16^{high}$)

NOTA: A partir das células vivas, a população de granulócitos foi selecionada com base na dupla marcação de CD66b e CD11b e, a partir da população de granulócitos, os neutrófilos foram selecionados com base na alta expressão de CD16.

3.4 AVALIAÇÃO DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA

3.4.1 Ensaios Imunoenzimáticos

A quantificação de biomarcadores plasmáticos para avaliação da translocação microbiana foi realizada por meio de ensaios imunoenzimáticos (ELISA, do inglês, *Enzyme-linked Immunosorbent Assay*) comerciais. Foram utilizados como marcadores: I-FABP (*Human I-FABP, Hycult Biotech*), para avaliar a morte de enterócitos (dano tecidual intestinal) e sCD14 (*Human sCD14 Quantikine ELISA kit, R&D Systems*), LBP (*Human LBP, Hycult Biotech*) e EndoCAb (EndoCab IgM, Hycult Biotech) como marcadores indiretos da translocação microbiana. Para a realização dos ensaios, as amostras foram diluídas 200X para sCD14, 1000X para LBP, 10X para I-FABP e 50X para EndoCAb IgM. Todos os ensaios foram realizados seguindo as recomendações dos

fabricantes. Para o EndoCAb IgM, a escala de medida MMU representa “unidades medianas padrão de IgM”, uma medida representativa dos intervalos medianos obtidos em análise de 1000 indivíduos adultos e saudáveis em uma localidade específica, segundo informações do fabricante. A leitura das absorvâncias foi realizada no espectrofotômetro *Epoch Biotek*, com o *software Gen5 Data Analysis*. A concentração de cada marcador a partir das absorvâncias foi determinada por meio de regressão não linear, utilizando uma curva de regressão logística (4-PL, do inglês, *4-parameter logistic*) (Apêndice C) e multiplicando pelo fator de diluição correspondente para cada um dos marcadores.

3.4.2 Quantificação do DNA Bacteriano

A quantificação do DNA bacteriano nas amostras de plasma dos pacientes foi realizada por meio de uma qPCR específica para o gene da subunidade ribossomal 16S bacteriana (149).

3.4.2.1 Extração dos ácidos nucleicos

O DNA total presente nas amostras de plasma foi obtido com o *kit DNeasy Blood and Tissue (Qiagen)* seguindo as recomendações do fabricante e otimizando a reação para maior recuperação de material genético de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (150). Para a extração, 500 μL de plasma foram centrifugados a 5000 g por 10 minutos. Após esse processo, o material foi fracionado em três alíquotas: 350 μL do sobrenadante adicionados em um microtubo (microtubo de extração I) e os 150 μL restantes foram homogeneizados e divididos em 2 alíquotas de aproximadamente 75 μL (microtubos de extração II e III), com a finalidade de otimizar a extração de DNA bacteriano (o protocolo elaborado encontra-se disponível como Apêndice D).

Para a melhor recuperação de DNA de bactérias Gram-positivas, o tubo de extração II foi incubado a 37°C por minutos após a adição de 180 μL de uma solução enzimática de lise (*enzymatic lysis buffer*) contendo Tris-Cl 20 mM pH 8, EDTA (*Sigma Aldrich*) 2mM, Triton X100 1.2% e Lisozima 20 mg/mL (*Sigma Aldrich*), sendo a lisozima adicionada no momento da reação, seguido de incubação a 37°C por 30 minutos. A melhor recuperação de DNA de bactérias Gram-negativas se deu pela adição de 180 μL do tampão ATL no tubo de extração III.

Sequencialmente, 20 µL de proteinase K e 200 µL de tampão AL foram adicionados nos microtubos de extração I, II e III, com incubação a 56°C por 30 minutos do microtubo de extração II, e 10 minutos para os tubos de extração I e III. Após incubação, 200 µL de etanol (96-100%) foram adicionados em todos os microtubos e homogeneizados em *vórtex* por 15 segundos. Na sequência, o material foi transferido para a coluna de separação (*DNeasy Mini spin column*) em alíquotas de 750 µL até se esgotar todo o conteúdo dos 3 microtubos (1 coluna para os 3 microtubos de extração de cada amostra). Após a passagem de todo o material pela coluna, seguiu-se as etapas finais de acordo com o recomendado pelo fabricante: adição de 500 µL do tampão AW1 e centrifugação por 1 minuto a 6000 g, seguida da adição de 500 µL do tampão AW2 e centrifugação em rotação máxima por 3 minutos e, por fim, eluição do DNA com 50 µL de tampão AE.

3.4.2.2 Curva padrão para quantificação

A padronização da qPCR para quantificação do gene da subunidade ribossomal 16S bacteriana foi realizada tendo como base o trabalho desenvolvido por Liu e colaboradores (2012) (149). Inicialmente, foi obtida uma curva padrão para quantificação, seguida da padronização da reação.

Para a obtenção da curva padrão, uma alíquota proveniente de cultura pura de *Escherichia coli* DH5α (*Thermo Fischer Scientific*) foi utilizada como fonte de DNA genômico. Inicialmente, o material genético foi extraído seguindo o protocolo acima descrito e uma PCR convencional foi realizada com o objetivo de amplificar a quantidade de material genético para as etapas subsequentes. A seguinte reação foi utilizada: 1X *PCR buffer* 10X, 1,5 mM de MgCl₂ 50 mM (*Thermo Fischer Scientific*), dNTP *mix* com 0,2 mM cada (Invitrogen), iniciadores 27F (5' – AGAGTTTGATCATGGCTCAG – 3') e 1492R (5' – TACGGTTACCTTGTTACGACTT – 3') (*Integrated DNA Technologies, Inc*) nas concentrações 0,4 e 0,2 µM, respectivamente, Taq DNA polimerase (*Platinum Taq DNA Polymerase, DNA free, Thermo Fischer Scientific*) 1,25 U/µL, 2 µL de DNA e água DEPC (*Diethyl pyrocarbonate*) em quantidade suficiente para (q.s.p) um volume final de reação de 50 µL. A utilização dos iniciadores 27F e 1492R para essa reação baseou-se no fato de permitirem a amplificação do gene 16S completo (149). A amplificação foi realizada em termociclador (*StepOnePlus, Applied Biosystems*) seguindo as condições descritas na tabela 2:

Tabela 2 – Condições de termociclagem para amplificação do gene 16S de *E.coli* DH5 α

Temperatura	Tempo	Ciclos
94°C	2 minutos	
94°C	30 segundos	
58°C	30 segundos	35X
72°C	2 minutos	
72°C	10 minutos	
4°C	∞	

Após amplificação, foi realizada uma eletroforese em gel de agarose 1% (Agarose, tampão TAE 1X, SYBR Safe DNA gel stain (Thermo Fischer Scientific)) para visualização do produto de amplificação. Um fragmento de aproximadamente 1500 pares de base foi observado, de acordo com o tamanho esperado para o gene 16S (figura 9). Uma vez estabelecidos os melhores parâmetros para a reação, 40 reações foram preparadas, totalizando aproximadamente 2 mL de DNA bacteriano puro amplificado para uso nas etapas subsequentes.

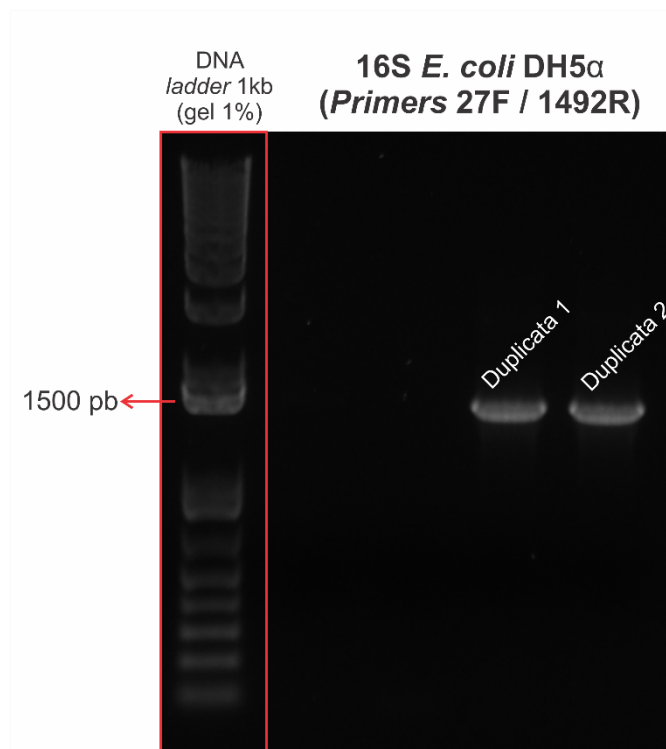


Figura 9. Visualização de fragmento amplificado do gene 16S de *E.coli* DH5 α após eletroforese em gel de agarose 1%

NOTA: O tamanho do fragmento amplificado foi de aproximadamente 1500 pb conforme observado pelo padrão de peso molecular utilizado, DNA ladder 1kb (Invitrogen). Após padronizada a melhor reação de amplificação, 40 reações foram realizadas, gerando material genético suficiente para padronizar a curva padrão.

Uma única alíquota de todo material amplificado foi preparada, seguido pela quantificação do material genético total recuperado por meio do reagente Qubit dsDNA (*Thermo Fischer Scientific*), seguindo recomendações do fabricante. Após quantificação, o número de cópias de moléculas de DNA foi calculado utilizando a fórmula:

$$\text{Número de cópias} = \frac{(\text{concentração DNA (ng/}\mu\text{l)}) \times [6.022 \times 10^{23}]}{(\text{tamanho do fragmento (bp)} \times [1 \times 10^9] \times 650)}$$

Na sequência, uma diluição inicial foi realizada para obter uma quantidade de DNA na ordem de 10^9 cópias e, a partir dessa, diluições seriadas na razão 10 foram realizadas, obtendo quantidades de DNA até 10^1 cópias, estabelecendo uma primeira curva de quantificação para o 16S (curva teste).

3.4.2.3 Validação dos iniciadores e determinação de curva padrão com material puro

O conjunto de iniciadores e reação de qPCR escolhidos para quantificação do gene 16S foram obtidos do trabalho de Liu e colaboradores (2012) (tabela 3) (149). Inicialmente, foi avaliado o correto anelamento dos iniciadores e sonda tendo como fonte de DNA (DNA *template*) o material amplificado pela reação de PCR convencional e utilizado para preparo da primeira curva de quantificação (a partir deste ponto denominado “DNA puro”). Para tanto, foi realizada uma reação com 900 nM de cada um dos iniciadores (Set02F e Set02R), 200 nM da sonda, *2X TaqMan Fast Advanced Master Mix (Applied Biosystems)* 1X concentrado, 2 μL do “DNA puro” e água DEPC q.s.p 20 μL . As etapas de amplificação foram realizadas no equipamento *StepOne Plus (Applied Biosystems)*, seguindo o protocolo de reação rápida: 50°C por 3 minutos, 95°C por 10 minutos e 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto.

Tabela 3 – Iniciadores utilizados para quantificação do gene da unidade ribossomal 16S bacteriana

Iniciador	Sequência de nucleotídeos (5’-3’)	Posição no genoma (<i>E.coli</i>)*
Set02F	CCTACGGGDGGCWGCA	341–356
Set02R	GGACTACHVGGGTMTCTAATC	786–806
Sonda	(6FAM) 5’-CAGCAGCCGCGGTA-3’ (MGBNFQ)	519–532

* Adaptado de Liu e colaboradores (2012) (149)

Com esta reação, foi observado que houve amplificação de DNA com os iniciadores selecionados, funcionalidade da sonda para quantificação, além de demonstrar que o produto amplificado na primeira PCR era adequado para ser utilizado na curva padrão. Sequencialmente, o DNA puro bacteriano foi adicionado a um *pool* de amostras de plasma de indivíduos saudáveis para posterior extração, a fim de gerar uma amostra de DNA *spiked*, ou seja, o mesmo DNA bacteriano, porém, extraído não mais de uma cultura pura de bactéria, mas da mesma matriz biológica (plasma) das amostras dos pacientes.

Resumidamente, cerca de 10 mL de plasma de diferentes indivíduos saudáveis foram adicionados em um tubo cônico de 15 mL, centrifugados em rotação máxima para remoção de debris celulares. Do sobrenadante, 6 mL foram transferidos para um novo tubo cônico e o “DNA puro” foi adicionado numa diluição de 1/4 (2 mL de DNA e 6 mL do plasma centrifugado), constituindo o plasma *spiked* (referindo-se ao enriquecimento de um plasma sem infecções conhecidas com DNA bacteriano puro). Na sequência, o DNA foi extraído dos 8 mL seguindo o protocolo de extração estabelecido no item 3.4.2.1 e apêndice 4. Este DNA extraído (agora chamado “DNA *spiked*” para diferenciá-lo do DNA puro) foi quantificado utilizando a curva padrão de DNA puro previamente elaborada (curva teste). Após quantificação, foi realizada uma diluição do “DNA *spiked*” de 10^8 até 10^0 cópias. Na sequência, procedeu-se a uma reação com as diluições do “DNA puro” e “DNA *spiked*” para verificar a reprodutibilidade entre as duas curvas.

A melhor reprodutibilidade e equivalência de resultados de decaimento entre as diluições da curva de DNA puro e DNA *spiked* foram observados com os parâmetros de reação expressos nas tabelas 4 e 5.

Tabela 4 – Reação da PCR padronizada para quantificação do gene 16S

Reagente	Concentração estoque	Concentração reação	Volume por reação (μ L)
TaqMan Fast Advanced			
Master Mix	2X	1X	10
Set02F	10 μ M	900 nM	1,8
Set02R	10 μ M	900 nM	1,8
Sonda	25 μ M	200 nM	0,2
Água DEPC	-	-	4,2
DNA (diluição curva ou amostra)	-	-	2
Total	-	-	20

Tabela 5 – Parâmetros utilizados para termociclagem e amplificação

Temperatura	Tempo	Ciclos
50°C	3 minutos	1X
95°C	10 minutos	1X
95°C	15 segundos	38X
59°C	1 minuto	

Com a melhor reação de PCR determinada, a validação final da curva padrão de DNA *spiked* foi realizada por meio de uma corrida em decaplicata com as diluições de 10^7 até 10^0 cópias (iniciou-se a curva em 10^7 cópias por conta da melhor equivalência observada para o DNA *spiked* e puro). Não foi possível observar diferença no decaimento entre as diluições de 10^1 e 10^0 , portanto, o limite de quantificação da curva foi estabelecido até 10^2 cópias, última diluição observada com bom decaimento e, conseqüentemente, possibilidade de boa quantificação (figura 10).

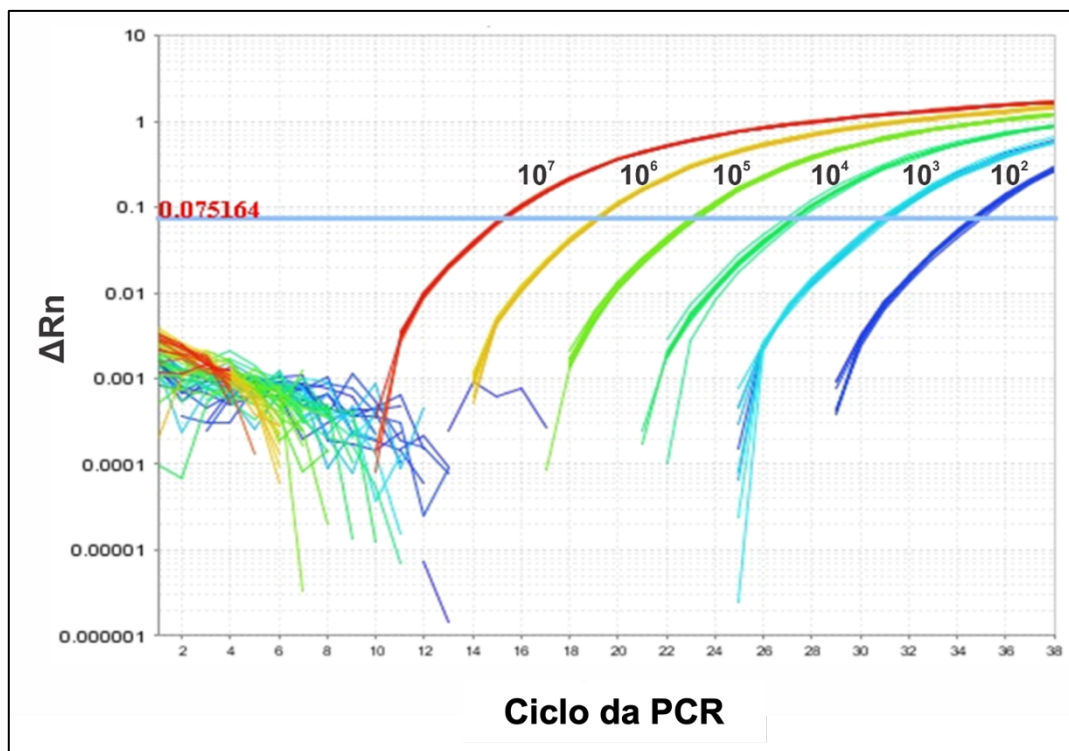


Figura 10. Decaplicata da curva de DNA *spiked* gerada para quantificação do DNA 16S

NOTA: Devido a observação de melhor equivalência entre as curvas de DNA puro e *spiked* no intervalo entre as diluições de 10⁷ a 10², eliminou-se diluições maiores que 10⁷ e menores que 10² da curva *spiked*, realizando-se a reação em decaplicata considerando apenas essas 6 diluições e estabelecendo o limite de quantificação em 100 cópias/μL.

3.4.2.4 Quantificação do DNA bacteriano 16S nas amostras de plasma dos pacientes

Uma vez que a curva padrão e os melhores parâmetros de reação (tabelas 3 e 4) foram estabelecidos, a quantificação do gene 16S foi realizada nas amostras de plasma dos pacientes infectados com o YFV coletadas na fase aguda (n = 90) e convalescente (n = 16) da infecção, de indivíduos recém-vacinados com 17DD (n = 10) e de indivíduos não infectados e sem vacinação recente (n = 9). Todas as amostras foram quantificadas em duplicata, utilizando a média dos valores para as análises posteriores.

3.4.3 Sequenciamento do Gene 16S

A análise de sequenciamento foi realizada pela empresa Neopropecta (Florianópolis-SC). De forma resumida, alíquotas de 30 μL (5 ng/μL) de DNA extraído foram encaminhadas para a empresa para realização do sequenciamento das alças V3/V4

do gene 16S. O preparo da biblioteca foi realizado por meio de protocolo padronizado pela empresa, com a amplificação do material utilizando os iniciadores 341F (5'–CCTACGGGRSGCAGCAG–3') (151) e 806R (5'–GGACTACHVGGGTWTCTAAT–3') (152,153) para as regiões V3/V4. As bibliotecas foram então sequenciadas por meio da plataforma MiSeq (*MiSeq Sequencing System, Illumina Inc, USA*), utilizando o kit V2, com 300 ciclos e sequenciamento do tipo *single-end*. Os resultados foram entregues na forma de arquivos do tipo FASTQ para realização das análises bioinformáticas.

3.4.3.1 Análises bioinformáticas

As análises bioinformáticas do *amplicon* 16S rRNA foram realizadas utilizando as plataformas Qiime 2, versão 2020.11 (154) e Phyloseq, versão 1.34.0 (155), este último um pacote de análise implementado no R. Para a análise, não foi necessário realizar a demultiplexação dos arquivos FASTQ das amostras, pois, cada uma das amostras sequenciadas já estavam demultiplexadas, com seus arquivos FASTQ separados.

Inicialmente, os arquivos FASTQ foram submetidos a uma etapa de pré-processamento e controle de qualidade utilizando a ferramenta DADA2 (156), implementada na plataforma Qiime 2, versão 2020.11 (154), a qual realiza a remoção de sequências de baixa qualidade, detecção, remoção de ruídos provenientes do sequenciamento (do inglês, *denoising*), remoção de quimeras e obtenção das variantes de sequência única (ASVs, do inglês, *Amplicon Sequence Variant*). Como o sequenciamento foi realizado em diferentes corridas, para cada grupo de amostra (grupos/lotos A ao E, referente à corrida de sequenciamento) foi realizado esse processamento inicial com o intuito de obter o perfil de erro de sequenciamento associado a cada corrida (156).

Para a filtragem de sequências de baixa qualidade foram descartados *reads* com um número de erros esperados de sequenciamento >2 e que apresentaram qualidade em escala de PHRED <11 . O tamanho das *reads* foi truncado para todas as amostras em 300 pb no sentido *foward* e 200 pb no sentido *reverse* por apresentarem declínio na qualidade dos pares de bases de nucleotídeos nestas posições. Foi utilizado o parâmetro *min_fold_parent_over_abundance* para a identificação e remoção de sequências quiméricas considerando as potenciais sequências parentais a serem testadas como quiméricas com um valor de abundância > 8 em *fold-change*. Após processamento e checagem da qualidade, as ASVs obtidas foram combinadas em uma matriz de composição com a contagem de *reads* atribuída a cada ASV identificada nas amostras.

Em seguida, visando obter a classificação taxonômica das ASVs identificadas, o classificador bayesiano implementado na sub-função *classify-sklearn* disponível na função *q2-feature-classifier* da plataforma Qiime2 foi aplicado. O classificador taxonômico foi treinado utilizando como referência as sequências de 16S do banco de dados RDP (*Ribosomal Dataset Project*, versão 11.5), utilizando um threshold de 99% de similaridade de sequência. Uma tabela de composição foi então gerada, contendo a classificação taxonômica das ASVs identificadas, e importada para o ambiente R (versão 4.1) para a condução das análises posteriores utilizando os pacotes Microbiome v1.6.0 e Phyloseq v1.28.0 (155). A abundância microbiana foi determinada considerando as famílias bacterianas encontradas em pelo menos 5% das amostras dentro de cada um dos grupos. As diversidades alfa (α -diversidade) e beta (β -diversidade) foram calculadas pelas métricas de Shannon e Bray-Curtis, respectivamente. Por fim, uma análise de correlação de Spearman entre a diversidade alfa e os marcadores de translocação microbiana avaliados, bem como variáveis clínicas (contagem de neutrófilos e MELD score) foi realizada utilizando o pacote rstatix v0.7.2 implementado no software R (versão 4.2.1) e visualizações gráficas utilizando os pacotes ggcorrplot v0.1.4, ggplot2 v3.4.0 e ggpubr v0.5.0.

3.5 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas e construções de gráficos foram realizadas utilizando o software *GraphPad Prism*, versão 7.0. As variáveis categóricas foram expressas como frequência e porcentagem, sendo analisadas quanto a diferença entre os grupos óbito e sobrevivente pelo teste de Qui-Quadrado. As variáveis numéricas foram testadas quanto ao tipo de distribuição pelo teste de Shapiro-Wilk e, quanto às diferenças, pelo teste de Mann-Whitney, sendo as mesmas expressas como mediana e intervalo interquartil. Para avaliação da validade preditiva e determinação de pontos de corte para as variáveis entre óbitos e sobreviventes foram construídas curvas ROC (do inglês, *Receiver Operating Characteristic*) considerando os melhores valores de especificidade sem perder sensibilidade. A partir desses dados, curvas de sobrevivência pelo método de Kaplan-Meier foram elaboradas, com aplicação do teste de Mantel-Cox (logrank test) para demonstrar a associação entre as variáveis e o desfecho óbito. Um p-valor inferior a 0,05 foi considerado para avaliação da significância estatística.

4. RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA E O IMPACTO DA FRAÇÃO LEUCOCITÁRIA NO CURSO DA FEBRE AMARELA

Foram incluídas neste estudo amostras de 90 pacientes, confirmadamente positivos para febre amarela, obtidas entre os anos de 2018 e 2019. Destes, 27 foram a óbito ao final do período analisado (60 dias de acompanhamento), com uma taxa de letalidade de aproximadamente 30%. Considerando que as análises clínico-epidemiológicas dos pacientes foram conduzidas em trabalho anterior com os casos obtidos no período de janeiro a maio de 2018 e que no período de 2019 houve um número menor de casos e óbitos (24 casos e 2 óbitos), neste trabalho optou-se por apresentar uma análise descritiva com o total dos casos obtidos nos períodos de 2018 e 2019 apenas com as características de maior interesse para os objetivos propostos (tabela 5), visto que, ao somar os casos dos dois anos, o perfil observado é semelhante ao já descrito previamente em trabalho publicado pelo nosso grupo de pesquisa (64).

Conforme previamente observado, um aumento significativo na contagem absoluta de leucócitos foi verificado nos óbitos em comparação aos sobreviventes, sendo que o mesmo ocorreu com a contagem de neutrófilos, com medianas de 4830 (IQ 3130-9080) e 1750 (IQ 1200-2840), respectivamente. Apesar de não atingir significância estatística, a contagem de linfócitos apresentou uma tendência de redução nos óbitos quando comparado aos sobreviventes. Em conjunto, estes achados demonstraram uma associação entre a contagem de neutrófilos e o desfecho óbito nos pacientes com febre amarela, conforme previamente publicado (64). Adicionalmente, a razão neutrófilos/linfócitos (NLR, do inglês, *neutrophil lymphocyte ratio*) foi calculada, apresentando-se significativamente elevada nos indivíduos que foram a óbito quando comparado aos sobreviventes (tabela 6). Por fim, como métrica de dano hepático nos pacientes, o MELD score foi obtido, visto sua associação direta com gravidade na infecção pelo YFV em trabalho colaborativo de nosso grupo de pesquisa e disponível em repositório online (78).

Tabela 6 – Características clínico-epidemiológicas dos casos confirmados de febre amarela obtidos nos períodos de janeiro a maio de 2018 e janeiro a abril de 2019

	Geral (n=90)	Sobreviventes (n=63)	Óbitos (n=27)	<i>p value</i>
Idade (anos)	44 (31-54)	42 (30-48)	50 (36-63)	0.0193
Sexo				
Masculino	82 (91.11%)	55 (87.30%)	27 (100%)	NS
Feminino	8 (8.89%)	8 (12.70%)	-	
Etnia¶				
Branco	52 (57.78%)	33 (52.38%)	19 (70.37%)	NS
Não-branco	35 (38.88%)	28 (44.45%)	7 (25.92%)	
Dias de sintomas, na inclusão	8 (6-10)	8 (7-10)	7 (5-9)	0.0221
Dias para óbito	NA	NA	11 (8-14)	NA
Leucócitos§ (µL)	4100 (3050-5910)	3570 (2560-4620)	5880 (4280-11530)	< 0.0001
Linfócitos	910 (600-1480)	940 (600-1450)	820 (530-1630)	NS
Neutrófilos	2200 (1420-3900)	1750 (1200-2840)	4830 (3130-9080)	< 0.0001
Bastonetes	165 (72.50-367.50)	100 (60-250)	380 (270-1315)	< 0.0001
NLR	2.44 (1.37-4.94)	1.72 (1.20-3.59)	5.82 (3.88-9.88)	< 0.0001
Carga viral (log₁₀ cópias/mL)¥	4.8 (3.90-6.16)	4.37 (3.86-5.36)	5.59 (4.98-6.44)	0.0006
MELD score	16.50 (5.56-34.85)	12.04 (4.93-17.23)	36.25 (33.75-41.76)	< 0.0001

Dados expressos em n (%) ou mediana (IQR). ¶ Dados faltantes para três pacientes; § Dados faltantes para 6 pacientes (5 sobreviventes, 1 óbito); ¥ Dados faltantes para 17 pacientes (16 sobreviventes, 1 óbito). NS = não significativo, NA = Não aplicável

Trabalhos recentes têm demonstrado a associação entre a NLR e gravidade em casos da COVID-19, evidenciando o potencial valor preditivo desta variável (157–159). Além disso, também tem sido demonstrado o valor preditivo da NLR no diagnóstico e prognóstico de mortalidade em casos de sepse (160–163). Neste estudo, o valor preditivo da NLR foi mensurado por meio da construção de uma curva ROC, obtendo uma área sob a curva (AUC, do inglês, *Area Under Curve*) de 0,855 (IC95% [0,764-0,945]) (figura 11A) e um ponto de corte estabelecido em 4,71, com sensibilidade de 0,65 (IC95% [0,44-0,83]) e especificidade de 0,91 (IC95% [0,81-0,97]). Com base no ponto de corte estabelecido pela curva ROC e considerando o desfecho óbito, os casos foram categorizados e uma curva de Kaplan-Meier elaborada, demonstrando a redução na sobrevivência quando a NLR foi superior a 4,71 (figura 11B).

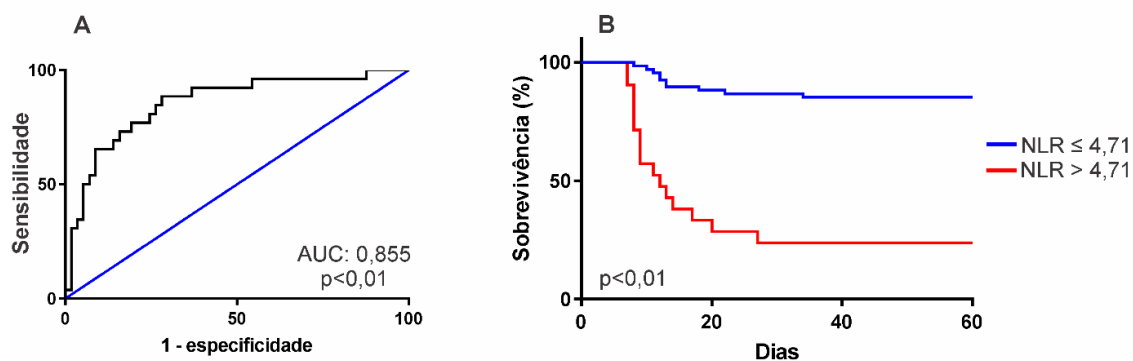


Figura 11. Valor preditivo da NLR para óbito na infecção pelo YFV

NOTA: **A)** Curva ROC elaborada a partir dos dados de NLR de óbitos e sobreviventes. **B)** Curva de Kaplan-Meier ilustrando a redução na taxa de sobrevivência.

Tais resultados demonstram o potencial da NLR como marcador prognóstico de mortalidade na FA, semelhante ao observado para a contagem de neutrófilos em trabalho anterior (64). O uso da NLR como marcador prognóstico é interessante não apenas pela fácil obtenção a partir de uma análise de hemograma, mas também por ser uma medida que sugere um potencial desequilíbrio da resposta imune, com a exacerbação da resposta imune inata (164,165). Além disso, a NLR também contribuiu para demonstrar não apenas o aumento de neutrófilos como também uma redução na contagem de linfócitos que, apesar de não ter atingido significância estatística nessa coorte, demonstrou redução mais acentuada nos óbitos quando comparado aos sobreviventes.

Classicamente em quadros virais, ao analisar a fração leucocitária em hemograma, é comumente observada uma redução na contagem global de leucócitos – devido, principalmente, à queda na quantidade de neutrófilos –, ao mesmo tempo em que se observa uma linfocitose reativa (29,166). Diferentes estudos demonstraram a ocorrência de leucopenia em infecções por outros flavivírus, como DENV e zika vírus (ZIKV) (167,168). Em estudo conduzido por Daumas e colaboradores (2013), uma contagem global de leucócitos inferior a 3760 células/mm³ demonstrou-se independentemente associada ao diagnóstico da dengue, além da observação de que quadros de leucopenia, neutropenia e linfopenia foram associados a ocorrência de extravasamento plasmático (167,169). Neste estudo, entretanto, a contagem global de leucócitos, neutrófilos e a NLR, apresentaram-se relativamente elevada nos casos que evoluíram para óbito quando comparado aos sobreviventes. Neste sentido, é possível que o desenvolvimento de uma resposta inflamatória aguda e intensa tenha contribuído para tal elevação e gravidade observada na febre amarela.

Um processo inflamatório caracterizado pela liberação de citocinas pró-inflamatórias (TNF- α , IL-6 e IL-1, por exemplo) pode promover o estímulo para produção e liberação de neutrófilos da medula óssea, fenômeno que é comumente observado durante um quadro infeccioso de origem bacteriana, sistêmico ou não (170,171). Por conta da rápida mobilização, parte das células imunes liberadas na circulação sistêmica não atingem o estágio final de maturação. Neste contexto, um aumento no células conhecidas como bastonetes, que são neutrófilos imaturos ausentes de hiper nucleação, também podem ser observadas (172). De maneira interessante, na coorte avaliada nesse estudo, um número relevante de bastonetes foi detectado nos indivíduos infectados pelo YFV, sendo significativamente elevado no grupo que foi a óbito (tabela 5). Entretanto, importante ressaltar que o dado de contagem de bastonetes obtidos para os indivíduos dos grupos sobrevivente e óbito foi restrito, 48 e 15 indivíduos, respectivamente, e por isso, estudos em grupos amostrais mais amplos são necessários para confirmar o potencial uso desse dado como um marcador de gravidade e mortalidade na febre amarela.

O aumento de neutrófilos na circulação periférica, segmentados ou não, pode ser interpretado como um indicador da ocorrência de um quadro inflamatório sistêmico desencadeado pela presença de produtos de origem bacteriana, como o LPS (107,148). Neste sentido, procedeu-se a uma análise fenotípica e funcional de neutrófilos, bem como a pesquisa de marcadores de translocação microbiana.

4.2 ANÁLISE FUNCIONAL E FENOTÍPICA DE NEUTRÓFILOS

A capacidade funcional e o fenótipo dos neutrófilos foram avaliados pela produção de ROS e pelos níveis de expressão de marcadores de superfície celular, respectivamente. Em trabalho recente, Opasawatchai e colaboradores (2019), demonstraram um aumento na produção de ROS em granulócitos de pacientes com dengue na fase febril da doença em relação à fase convalescente, evidenciando a ativação de granulócitos na infecção pelo DENV (105). No presente estudo, a produção de ROS foi mensurada pelo teste de oxidação do DHR em amostras de 11 pacientes com febre amarela, coletadas no momento de admissão hospitalar. Não houve diferença significativa observada entre a ativação de neutrófilos de pacientes infectados quando comparado aos neutrófilos obtidos de controles não infectados e sem vacinação recente (figura 12). Em conjunto, tais resultados mostram que a função dos neutrófilos manteve-se preservada nos indivíduos infectados pelo YFV.

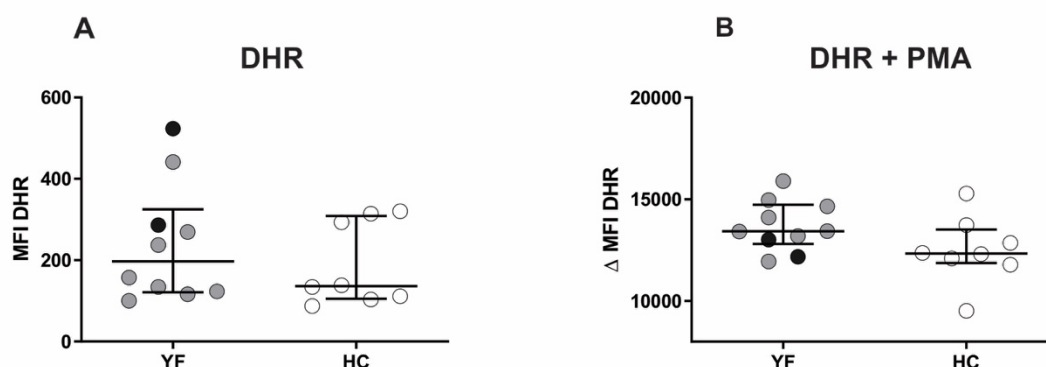


Figura 12. Produção de ROS por granulócitos de pacientes infectados pelo YFV

NOTA: **A)** *Dotplot* demonstrando a produção de ROS basal dos granulócitos, sem o estímulo com PMA, expresso como a intensidade média de fluorescência (MFI), nos indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela (YF, n = 10*) e controles não infectados (HC, n = 8). **B)** *Dotplot* demonstrando a produção de ROS dos granulócitos após estímulo com PMA, expresso como delta da intensidade média de fluorescência (Δ MFI, diferença entre a MFI do estímulo com PMA e a MFI do DHR apenas), nos indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela (YF, n = 10*) e controles não infectados e sem vacinação recente (HC, n = 8). Nos infectados, os pontos preenchidos em preto correspondem aos pacientes que foram à óbito. * Um dos pacientes em que a produção de ROS foi mensurada teve diagnóstico de febre amarela descartado, portanto, o tamanho amostral para o DHR foi de 10 indivíduos com infecção confirmada

A frequência e expressão de marcadores celulares relacionados à ativação de neutrófilos foram avaliadas por meio da técnica de citometria de fluxo nas amostras de 18 pacientes. Um aumento significativo na MFI de CD66b nos pacientes em relação aos

controles foi observado, além de uma redução na MFI do CD14 (figuras 13A e B). Resultados semelhantes foram encontrados no estudo de Opasawatchai e colaboradores (2019), em que a MFI do CD66b foi maior em granulócitos de pacientes na fase aguda da dengue, sendo esta reduzida ao longo do curso da doença (105). Não foram observadas diferenças na expressão de CD11b e CD16 (figuras 13C e D).

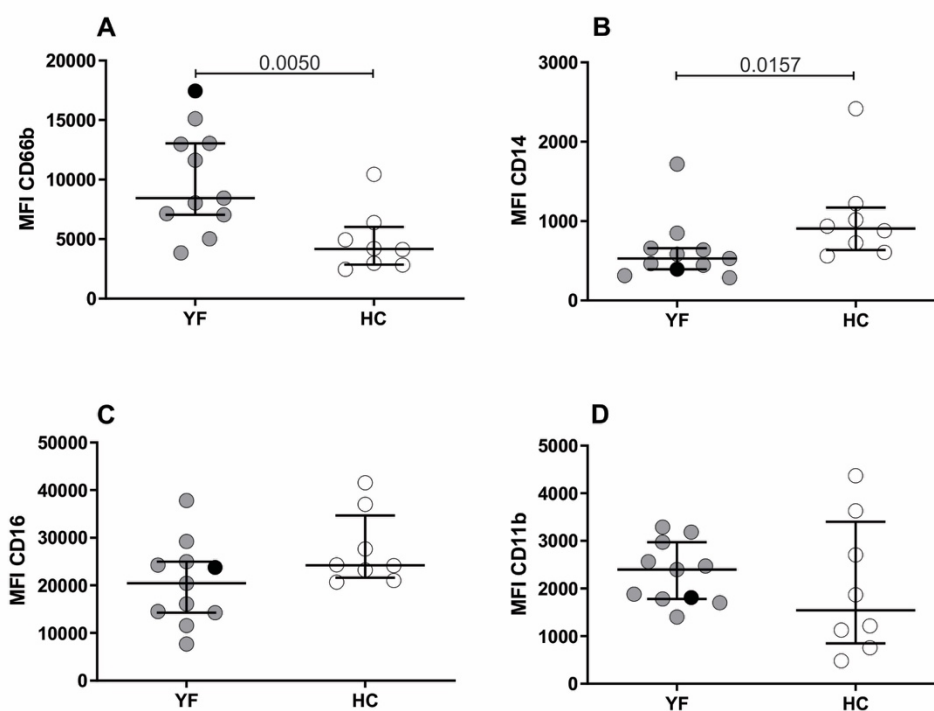


Figura 13. Ativação de neutrófilos em pacientes infectados pelo YFV na fase aguda

NOTA: A análise foi realizada com base nos valores da Média de Intensidade de Fluorescência (MFI) de CD66b (A), CD14 (B), CD16 (C) e CD11b (D) nos indivíduos infectados pelo vírus da febre amarela (YF, n = 11) e controles não infectados e sem vacinação recente (HC, n = 8). Nos infectados, os pontos em preto correspondem aos pacientes que foram à óbito.

O CD66b tem sido reportado como um marcador de ativação de neutrófilos, envolvido nos processos de adesão e degranulação (100,105). Em estudo conduzido por Schimdt e colaboradores (2012), foi observada uma expressão aumentada de CD66b em neutrófilos humanos estimulados com sobrenadante obtido de cultura de *Staphylococcus aureus*, além da correlação positiva entre o nível de expressão de CD66b e a concentração plasmática de lactoferrina, demonstrando o possível envolvimento deste marcador em uma infecção sistêmica (100). Dessa forma, o aumento da expressão do CD66b pode

sugerir o papel desse marcador no processo de ativação de neutrófilos em doenças infecciosas.

Com relação ao CD14, trata-se de uma proteína de membrana usualmente utilizada como marcador no estudo de monócitos. Entre suas ações na resposta imune, está o envolvimento como correceptor no processo de ativação pelo LPS, no qual é responsável por transferir o complexo LPS/LBP para o receptor TLR4 associado à molécula MD-2, levando à ativação da resposta imune (173). Como já citado, diante do desafio antigênico com LPS, o domínio de membrana do CD14 (mCD14) é clivado, sendo então secretado em sua forma solúvel, sCD14, o qual pode se ligar ao LPS e transferir para o complexo mCD14/TLR-4/MD-2 ou, em associação à LBP, transferir para lipoproteínas de alta densidade (HDL), reduzindo a estimulação antigênica e controlando a resposta (110,123).

Assim, a redução na expressão de mCD14, bem como o aumento de sCD14, podem ser interpretados como um mecanismo compensatório da estimulação pelo LPS e, por conseguinte, um indicativo indireto de um processo de translocação microbiana. Em estudo anterior, uma redução na MFI de mCD14 foi observada em macrófagos alveolares estimulados *in vitro* com LPS e *Escherichia coli*, com um aumento da forma solúvel (sCD14) no sobrenadante, demonstrando a inversão da relação CD14/sCD14 (174). Ainda, a elevação de sCD14 foi observada em soro e lavado broncoalveolar de crianças com pneumonia bacteriana quando comparadas à grupos controles não infectados (175). Apesar de não ter atingido significância estatística, a redução observada na MFI do CD16 também pode ter relação com uma resposta frente ao desafio pelo LPS, visto que, diante deste estímulo, é possível observar a presença bastonetes, células caracterizadas por menor expressão de CD16 em relação aos neutrófilos completamente maduros (90).

O envolvimento dos neutrófilos na supressão da resposta de células T diante do estímulo com LPS também tem sido reportado (90,91). É o caso do estudo conduzido por Bowers e colaboradores (2014), em que foi demonstrado que o estímulo de neutrófilos em pacientes saudáveis com LPS induziu o aumento da expressão do ligante do receptor de morte programada (PD-L1, do inglês, *Programmed death-ligand 1*) nestas células e que, tal aumento, correlacionou-se com a redução na resposta de células T em pacientes infectados pelo HIV. Entretanto, com base nos resultados obtidos neste estudo, não é possível inferir sobre esse papel supressor dos neutrófilos na infecção pelo YFV.

Por fim, com base nesses resultados, não é possível determinar se o aumento e redução da MFI de CD66b e CD14, respectivamente, estão relacionados à própria infecção pelo YFV ou por outro estímulo inflamatório. Ainda assim, em conjunto, os resultados encontrados nas análises funcional e fenotípica contribuíram para demonstrar que os neutrófilos de pacientes infectados pelo YFV encontravam-se ativados e sem perda de função. Assim, considerando o conhecido envolvimento dos neutrófilos em respostas a infecções bacterianas, a associação dos neutrófilos com gravidade na infecção pelo YFV e a prévia demonstração da translocação microbiana como fator de agravo na dengue (64,107), procedemos à investigação da ocorrência de translocação microbiana na febre amarela pela quantificação de marcadores diretos e indiretos deste fenômeno.

4.3 ANÁLISE DA TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA

4.3.1 Marcadores de Translocação Microbiana Apresentaram-se Elevados em Pacientes Infectados pelo YFV e que Evoluíram para Óbito

A avaliação da translocação microbiana foi realizada por meio de ensaios imunoenzimáticos em amostras de 90 pacientes. Foram analisados sCD14, LBP e EndoCAb IgM como marcadores indiretos da translocação, além de I-FABP e 16S, como indicador da quebra de barreira intestinal e marcador direto de translocação, respectivamente. Comparado aos grupos controles, todos os marcadores demonstraram-se significativamente alterados nas amostras dos casos de FA coletadas durante a fase aguda da infecção, como representado na figura 14.

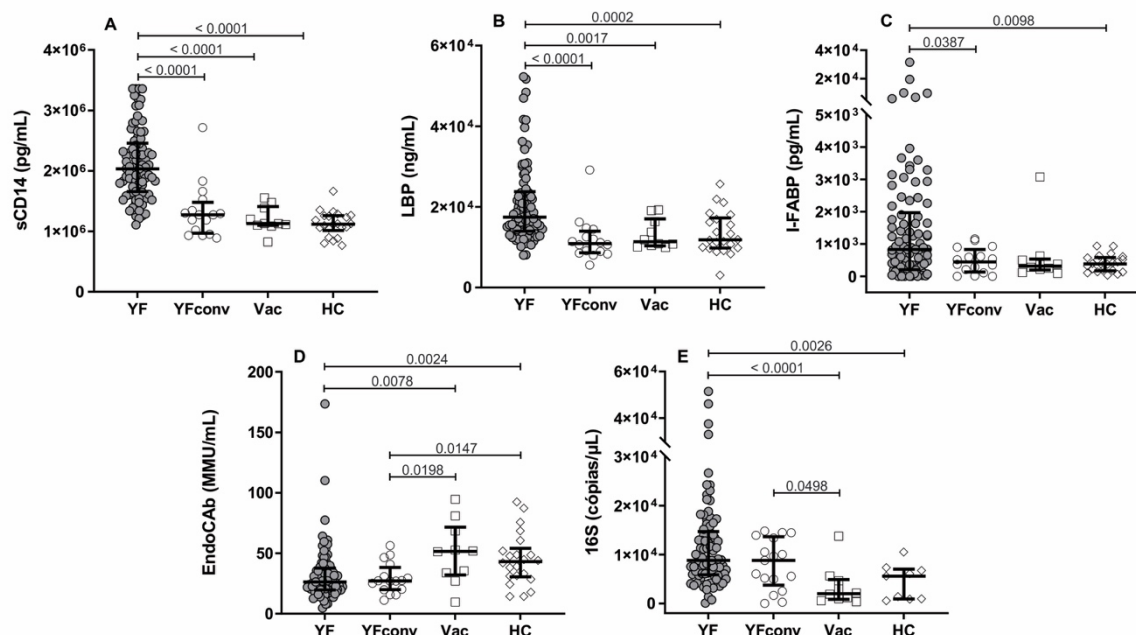


Figura 14. Análise de marcadores plasmáticos de translocação microbiana em pacientes infectados com o YF, na fase aguda

NOTA: Os níveis de sCD14 (A), LBP (B), I-FABP (C), EndoCAB IgM (D) e 16S (E) foram determinados por ensaio imunoenzimáticos (A-D) e molecular (E) em amostras de pacientes infectados na fase aguda (YF, n = 90), pacientes na fase de convalescência (YFconv, n = 16), indivíduos recém-vacinados contra a febre amarela (Vac, n = 10) e controles não infectados e sem vacinação recente (HC, n = 22*). * Na quantificação do 16S, no grupo de controles HC, o n = 9, por conta da disponibilidade de amostras.

Para os marcadores sCD14, LBP e I-FABP não houve diferença nos níveis observados entre pacientes na fase de convalescência, recém-vacinados e controles não-infectados, demonstrando homogeneidade entre estes grupos. As exceções foram para o EndoCAB e o 16S, para os quais foram observadas diferenças significativas na comparação dos grupos de amostras da fase de convalescência com o grupo de recém-vacinados (EndoCAB e 16S) e controles não infectados (EndoCAB) (figura 14D, E). Para esses dois marcadores (EndoCAB e 16S) não foram detectadas diferenças significativas entre amostras das fases aguda e convalescente da infecção (figura 14D, E). É importante pontuar, entretanto, que apesar do grupo convalescente representar indivíduos na fase de recuperação da infecção, ainda são indivíduos com uma infecção recente, podendo influenciar os níveis de EndoCAB e 16S observados. A quantificação dos marcadores em diferentes momentos contribuiria para demonstrar a tendência de aumento ou queda no curso clínico da infecção.

Dadas as diferenças observadas, os pacientes na fase aguda foram divididos em óbitos e sobreviventes, a fim de avaliar as particularidades entre estes grupos, utilizando como grupo comparativo desses dois desfechos clínicos as amostras de pacientes sobreviventes coletadas na fase de convalescença da doença (figura 15). Para sCD14 e LBP as diferenças se mantiveram, ou seja, óbitos e sobreviventes apresentaram níveis significativamente maiores desses marcadores quando comparados às amostras na fase de convalescença e demais grupos controles (recém-vacinados e não infectados) (figuras 15A e B). Ainda, os indivíduos que foram a óbito apresentaram níveis significativamente mais elevados que os sobreviventes.

Ao analisar os níveis de I-FABP, os pacientes que foram a óbito apresentaram níveis significativamente maiores que os sobreviventes e demais grupos (convalescente e controles) (figura 15C), sugerindo que a morte de enterócitos, um indicativo de quebra de barreira intestinal, ocorreu principalmente nos casos que tiveram pior evolução clínica. Por fim, não houve diferença observada entre óbitos, sobreviventes e convalescentes ao analisar os níveis do EndoCab e 16S (figuras 15D e E), apesar da observação de uma discreta redução dos níveis de EndoCab e elevação no número de cópias de 16S nos óbitos quando comparados com os sobreviventes e convalescentes.

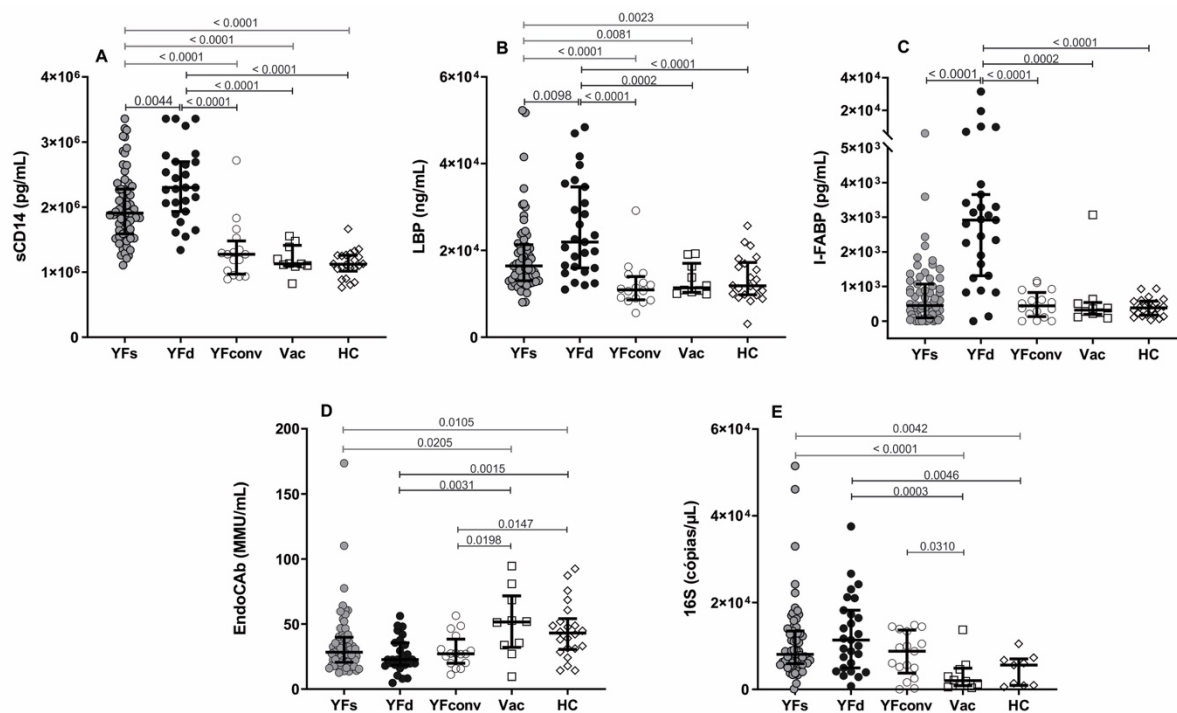


Figura 15. Análise de marcadores plasmáticos de translocação microbiana em pacientes infectados com o YFV, na fase aguda que sobreviveram e que foram a óbito

NOTA: Os níveis de sCD14 (**A**), LBP (**B**), I-FABP (**C**), EndoCAb IgM (**D**) e 16S (**E**) foram determinados por ensaio imunoenzimáticos (A-D) e molecular (E) em amostras de pacientes infectados, sobreviventes (YFs, n = 63), que foram a óbito (YFd, n = 27), pacientes na fase de convalescença (YFconv, n = 16), indivíduos recém-vacinados contra a febre amarela (Vac, n = 10) e controles não infectados e sem vacinação recente (HC, n = 22*). * Na quantificação do 16S, no grupo de controles HC, o n = 9, por conta da disponibilidade de amostras.

A associação da translocação microbiana com o agravamento da infecção pelo DENV tem sido demonstrada (107,148). Van de Weg e colaboradores (2013), em estudo conduzido com pacientes infectados pelo DENV no Brasil, observaram um aumento plasmático dos níveis de LPS, LBP e sCD14 naqueles que apresentaram quadros graves da doença (de acordo com classificação da OMS) e naqueles que evoluíram para choque por conta do extravasamento plasmático. No mesmo estudo, os autores classificaram os pacientes em grupos, tendo como base o perfil de citocinas na infecção, evidenciando maiores níveis de LPS, LBP e sCD14 nos grupos que apresentavam um elevado perfil pró-inflamatório, sugerindo a associação entre a translocação microbiana e uma intensa ativação imune (107). Os resultados do presente trabalho sugerem que níveis aumentados de sCD14 e LBP podem estar associados com gravidade na infecção pelo YFV. Além disso, de forma complementar, foi observado maior índice de dano intestinal nos casos que evoluíram para óbito, demonstrando uma possível relação entre a translocação microbiana como consequência da lesão intestinal.

A translocação microbiana é muito bem estudada no contexto de ativação imune crônica observado na infecção pelo HIV (114,125,176). Brenchley e colaboradores (2006), demonstraram a ocorrência de translocação microbiana como fator relacionado à ativação imune crônica na infecção pelo HIV. Níveis elevados de LPS foram observados em pacientes cronicamente infectados em comparação àqueles com infecção aguda e a indivíduos não infectados. Ainda, o aumento de sCD14 e LBP foi observado já na fase aguda, além da redução nos níveis de EndoCAb IgM e da correlação positiva entre os níveis de LPS e marcadores de ativação celular (114). Dessa forma, é possível que a ocorrência de translocação microbiana contribua para maior ativação imune e pior evolução clínica dos pacientes na infecção aguda pelo YFV.

Neste estudo, foi observado que pacientes infectados pelo YFV e que evoluíram para óbito apresentaram níveis significativamente elevados de sCD14, LBP e I-FABP. Em estudo conduzido por Sandler e colaboradores (2011), o nível plasmático de sCD14 apresentou-se como um fator independentemente associado a morte em pacientes com a

infecção pelo HIV (177). O mesmo trabalho observou níveis elevados de I-FABP nos pacientes que evoluíram para óbito, porém, sem significância estatística quando comparados ao grupo controle (177). Por outro lado, níveis elevados de I-FABP foram associados a óbito em pacientes HIV positivos, com histórico de AIDS, e em pacientes com infecção por hantavírus (115,147). Mais recentemente, foi demonstrado níveis elevados de I-FABP em crianças com malária grave, no momento da admissão hospitalar, e que evoluíram para óbito (116). Assim, é possível que a perda da integridade intestinal indicada pelos resultados obtidos neste estudo nas amostras de fase aguda da infecção pelo YFV e sua associação com óbito reforçam a ideia de que a translocação microbiana pode ser um fator de agravo no curso da infecção.

Ao analisar os níveis de 16S, entretanto, não foram observadas diferenças significativas no grupo de pacientes que evoluíram para óbito, apesar de uma tendência de aumento em relação aos demais grupos. A ocorrência ou não de significância estatística nos níveis de 16S tem sido observada em diferentes estudos envolvendo a infecção pelo HIV (124,125,128,178). Em estudo conduzido por Luo e colaboradores (2022), os autores observaram que pacientes infectados com o HIV e com contagem de células T CD4⁺ inferior a 300 células/ μ L apresentaram níveis de 16S significativamente elevados em comparação aos indivíduos com melhor contagem de células (>700 células/ μ L) (178). Em estudo conduzido por Tudesq e colaboradores (2017), apesar de não terem sido detectadas diferenças significativas nos níveis de 16S ao comparar indivíduos coinfectados com HIV e HCV e controles não infectados, entretanto, neste mesmo trabalho os autores observaram um aumento significativo dos níveis de 16S ao considerar o tempo de infecção pelo HIV (124). Neste sentido, considerando o caráter agudo da infecção pelo YFV e o curto intervalo na evolução para óbito observado nessa coorte de pacientes (64) (tabela 5), é possível que não tenham sido detectadas maiores flutuações nos níveis de 16S devido à rápida evolução clínica. Uma seleção amostral em momento mais próximo à data de óbito poderia trazer novos *insights* sobre um potencial aumento dos níveis de 16S nos óbitos, alcançando diferenças significativas ao comparar os sobreviventes.

Adicionalmente, é importante ressaltar que, ainda que a quantificação do 16S apresente algumas vantagens metodológicas em relação à dosagem do LPS, o uso do marcador genético também possui suas limitações, como por exemplo, a possível contaminação de reagentes de biologia molecular com DNA bacteriano (179,180). Ainda,

a matriz biológica utilizada para quantificação (neste estudo, plasma) também pode conferir um fator limitante, visto observações de i) maior recuperação de DNA bacteriano ao se utilizar sangue total ou a papa leucocitária ou ii) recuperação de DNA bacteriano no plasma condicionada ao processamento das amostras, em especial à velocidade de rotação utilizada na separação das frações do sangue (plasma, papa leucocitária e hemácias) (141,150). Por fim, a reação de PCR utilizada pode conferir uma limitação, visto a não existência de uma padronização geral, com diferentes iniciadores, sondas e ciclos de amplificação, ocasionando a existência de diferentes eficiências de amplificação, por exemplo (179). Neste sentido, a combinação de ambos os marcadores, LPS e 16S, contribuiria para melhor elucidação da ocorrência de translocação microbiana como fator agravante na infecção pelo YFV (181).

Ainda assim, considerando (i) os achados para os marcadores sCD14, LBP e I-FABP, em especial este último, que sinaliza para um maior dano intestinal e que se apresentou significativamente aumentado nos óbitos sem diferença entre aqueles que sobreviveram e grupos controles (figura 15C); e (ii) o indicativo de maior comprometimento hepático observado no grupo de infectados que evoluíram para óbito (MELD score, tabela 6), é possível que a existência de uma translocação microbiana ainda seja um fator direcionador de um pior curso clínico na infecção pelo YFV.

4.3.2 Análise do Perfil Microbiano Plasmático nos Pacientes Infectados pelo YFV Selvagem

Nos últimos anos, a aplicação do sequenciamento do gene 16S em amostras de sangue ou hemocomponentes vem sendo utilizada como interessante ferramenta metodológica, gerando novos *insights* sobre como a presença ou ausência de determinados grupos de bactérias, bem como a interação/impacto dessa composição microbiológica com o perfil transcriptômico, de metabólitos e de citocinas que podem influenciar os processos imunopatológicos de diferentes doenças, infecciosas ou não (144,145,182–184). Nesse contexto, o sequenciamento do gene 16S bacteriano foi realizado nas amostras de plasma dos pacientes infectados pelo YFV e nas fases aguda (sobreviventes e óbitos) e de convalescença da doença, dos indivíduos recém-vacinados e nos controles não infectados e sem vacinação recente, totalizando 126 amostras (figura 6).

Conforme mencionado, as amostras foram subdivididas em grupos e sequenciadas em corridas independentes. Assim, inicialmente procedeu-se a uma análise para verificar a ocorrência de um potencial efeito de lote entre as diferentes corridas. Para tanto, os 5 grupos de amostras (grupos A a E) foram processados separadamente e suas ASVs obtidas; uma análise de componente principal (PCoA) foi realizada e observou-se que todas as amostras pertencentes ao grupo E apresentaram um perfil microbiológico distinto das demais, possivelmente gerado devido a um efeito de lote potencialmente gerado pela falha do sequenciamento a partir do iniciador reverso nas amostras integrantes deste grupo (figura 16).

Assim, as 12 amostras pertencentes ao lote E foram excluídas e 111 amostras foram consideradas para as análises posteriores, distribuídas da seguinte forma: 78 pacientes infectados com YFV e na fase aguda inclusos neste estudo (53 sobreviventes e 25 óbitos), além de 16 amostras dos pacientes infectados coletados na fase de convalescença, 10 indivíduos recém-vacinados e 7 controles não infectados e sem vacinação recente.

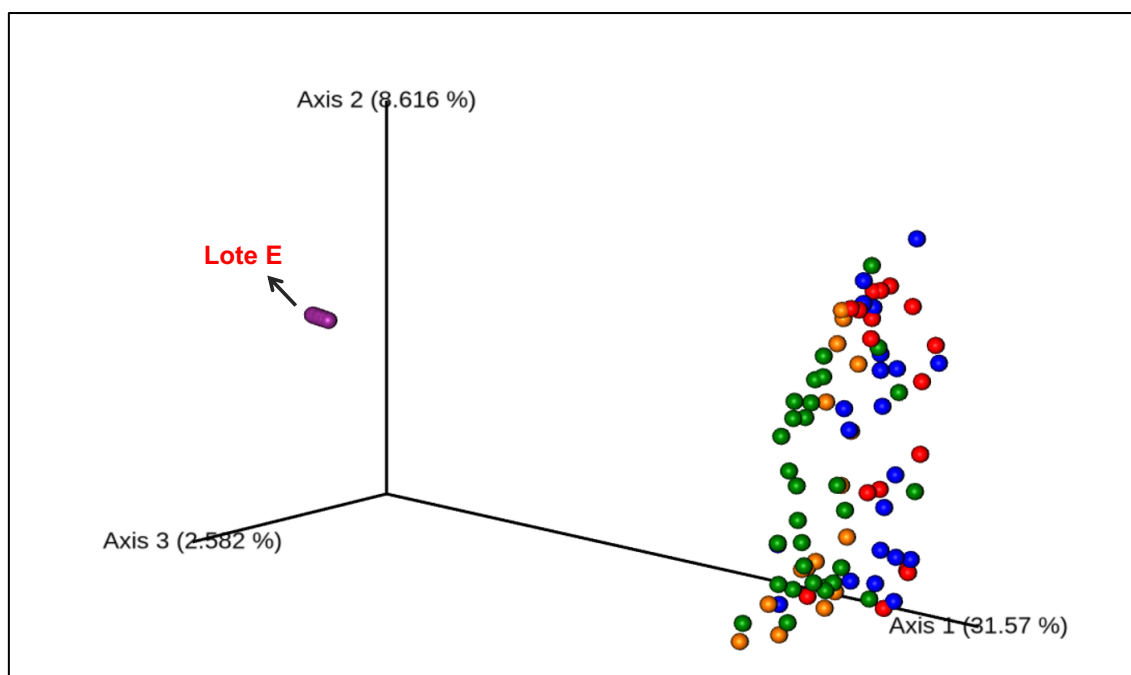


Figura 16. PCoA obtido pela métrica de Bray-Curtis das amostras, com base no lote de sequenciamento

NOTA: Um total de 126 amostras foram subdivididas em 5 grupos/lotos e sequenciadas em corridas independentes (nomeadas de A ao E). Conforme observado, à exceção do lote de amostras E, todos os demais se agruparam de forma uniforme, com a componente principal do eixo 1 explicando mais de 30% da variância dos dados. As amostras do lote E, entretanto, apresentaram um perfil diferente do observado das demais, sugerindo um perfil de microbioma distinto. Para as análises posteriores, as 12 amostras incluídas neste grupo foram removidas da análise do perfil microbiológico plasmático.

De modo geral, o perfil microbiológico, bem como a diversidade bacteriana encontrados no plasma dos pacientes infectados (fase aguda e convalescente), indivíduos recém-vacinados e indivíduos não infectados e sem vacinação recente foram semelhantes. A Figura 17 representa os resultados dos indivíduos infectados pelo YFV (fase aguda, sobreviventes $n = 53$, óbitos $n = 25$) e convalescentes. Nota-se que o perfil microbiológico plasmático observado foi exclusivamente composto por proteobactérias, majoritariamente as famílias *Pseudomonadaceae*, *Moraxellaceae* e *Oxalobacteriaceae* (figura 17A). Não houve diferenças significativas observadas ao se comparar a abundância de cada uma das famílias individualmente entre os grupos.

A semelhança do perfil microbiológico encontrado pode ser observada pela análise da β -diversidade, a qual considera cada amostra como um microbioma único (permitindo comparar quão similar ou diferente é a composição microbiana entre diferentes grupos e/ou ambientes) (129,185). Conforme observado, as amostras dos três grupos (sobrevivente, óbito e convalescente) apresentaram a mesma disposição espacial na análise de coordenadas principais, evidenciando quão similares são os perfis microbiológicos observados entre os grupos (figura 17B). Ainda, é possível notar que não há relação entre as famílias bacterianas e os grupos de indivíduos analisados (figura 17B).

A α -diversidade, por sua vez, permite analisar quão diversa é tal composição dentro de cada amostra individualmente (129,185). Com relação a esta métrica, pacientes que foram a óbito apresentaram uma redução comparado ao grupo de sobreviventes, entretanto, não foram observadas diferenças estatísticas ao comparar com o grupo de indivíduos da fase de convalescença (figura 17C). Comparada aos grupos controles (recém-vacinados e não infectados), a α -diversidade se manteve maior nos três grupos que compreendiam amostras dos pacientes infectados (óbito, sobreviventes (YF aguda); e convalescentes) (apêndice E).

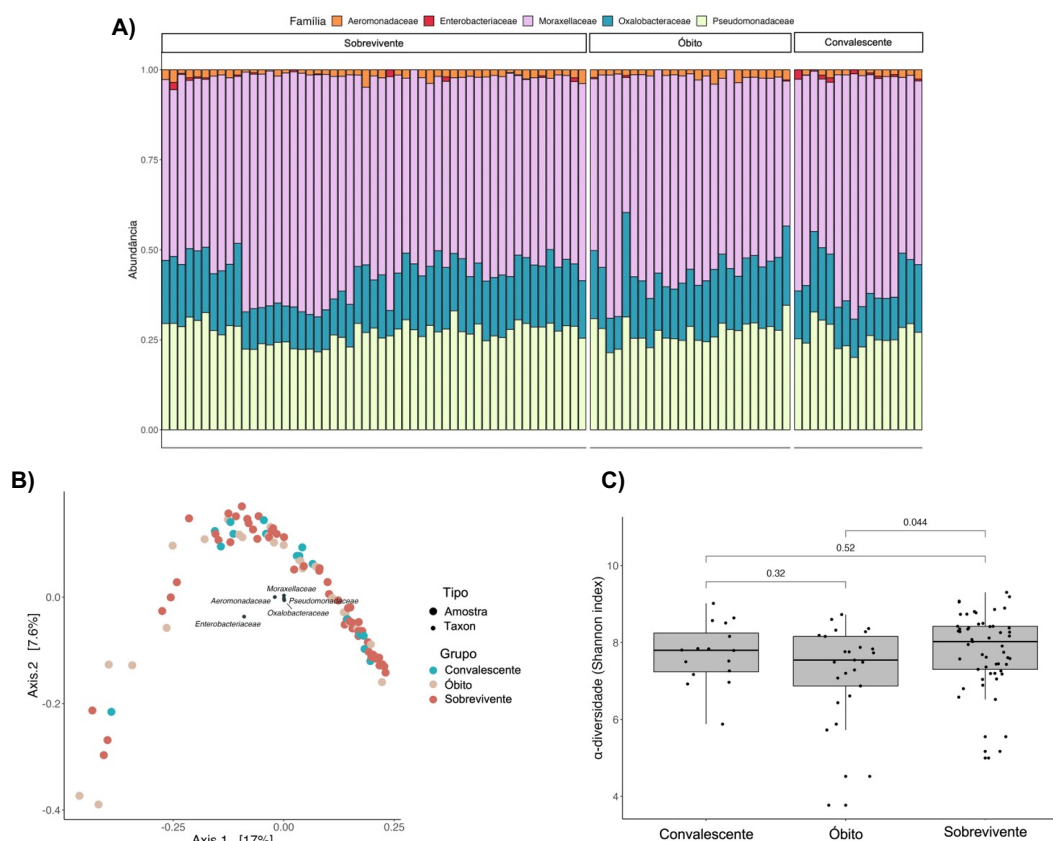


Figura 17. Perfil microbiológico plasmático dos pacientes infectados com YFV na fase aguda e convalescente da infecção.

NOTA: Em **A**), a abundância (expressa como frequência relativa) das famílias bacterianas observadas (em pelo menos 5% das amostras dentro de cada um dos três grupos analisados); em **B**), biplot representativo da β -diversidade (Bray-Curtis), com os grupos analisados (esferas coloridas) e famílias bacterianas encontradas (esferas pretas em menor tamanho) espacialmente distribuídas; em **C**), α -diversidade de Shannon para os três grupos. Em **A**), **B**) e **C**), Sobrevivente, n = 53; Óbito, n = 25; Convalescente, n = 16. Em **C**, teste de Wilcoxon aplicado para verificar diferenças entre as medianas dos grupos.

Entre as diferentes métricas para se calcular a α -diversidade está o índice de Shannon, que considera a riqueza (número de diferentes espécies em uma amostra) e abundância (quanto de cada espécie nessa amostra) (129,185). Neste contexto, o aumento da α -diversidade nos pacientes infectados pelo YFV (óbitos e sobreviventes) em comparação ao grupo controle não infectado pode ser um indicativo do aumento no número de diferentes táxons bacterianos na infecção pelo YFV, ao passo que a diferença observada entre óbitos e sobreviventes seja um indicativo da ocorrência de um desbalanço dessa diversidade, com determinados táxons bacterianos estando mais abundantes na composição microbiológica dos pacientes que evoluíram para óbito (144,186). Apesar

dessa possível explicação, ao analisar uma abundância diferencial entre os grupos de óbitos e sobreviventes, não foram observadas alterações significativas.

Conforme apresentado, não foram observadas diferenças no perfil microbiológico plasmático dos pacientes infectados, em fase aguda, que sobreviveram ou que foram à óbito (figura 17A). É importante pontuar que, baseado em nosso conhecimento, este é o primeiro estudo a caracterizar o perfil microbiológico plasmático de indivíduos infectados com o YFV, também não havendo estudos similares em outras arboviroses. Entretanto, é possível encontrar estudos que tenham investigado o perfil microbiológico plasmático na infecção pelo HIV e em processos patológicos com comprometimento hepático, órgão comprometido na infecção pelo YFV (128,144,186,187). Semelhante ao observado neste estudo, o perfil microbiológico circulante observado foi constituído majoritariamente por proteobactérias (144,186,187).

A semelhança do perfil microbiológico circulante observado entre os grupos reflete-se na β -diversidade, em que não foi possível identificar dissimilaridade entre os microbiomas (figura 17B). De maneira semelhante, em trabalho conduzido por Li e colaboradores (2018), os autores avaliaram o perfil microbiológico de indivíduos com pancreatite aguda, com e sem infecção associada, além de pacientes com sepsis confirmada, não identificando diferenças na β -diversidade desses três grupos (184). Neste contexto, é possível que um processo patológico, infeccioso ou não, influencie na diversidade microbiana de maneira a camuflar efeitos visualizáveis ao analisar grupos específicos (ex: óbitos e sobreviventes, porém, ambos infectados em fase aguda). Acrescenta-se a isso o fato de que a coorte de pacientes infectados pelo YFV neste estudo é composta por indivíduos que, ainda que não tenham ido à óbito, apresentaram quadros mais graves da doença, portanto, adicionando um potencial viés ao se olhar exclusivamente pacientes que foram a óbito ou que tenham sobrevivido (78).

Por fim, é importante ressaltar que a existência de um microbioma circulante e, conseqüentemente, quais grupos bacterianos o compõe, qual sua estrutura global em indivíduos saudáveis e alterações decorrentes ou causadas em processos patológicos, bem como esse perfil se associa a metabólitos, citocinas e marcadores genéticos, constitui campo científico em amplo crescimento (142,143). Neste sentido, da mesma forma que se busca desenvolver um bom trabalho de microbioma intestinal, por exemplo, o desenvolvimento de protocolos que contemplem desde a melhor matriz biológica, métodos de processamento e análise faz-se necessário para bons estudos envolvendo não

apenas a determinação e avaliação do microbioma plasmático, mas também a possibilidade do uso de ferramentas moleculares para identificação de patógenos, muitas vezes não identificados por métodos tradicionais (130–132,141,150,188). Assim, ainda que não tenham sido observados resultados significativos de perfil microbiológico neste estudo, o ineditismo desses resultados é de grande importância e interesse no campo científico.

4.3.3 Correlação entre Marcadores de Translocação Microbiana, Variáveis Clínicas e Perfil Microbiológico Plasmático dos Pacientes Infectados com o YFV

Apesar da diferença observada na α -diversidade entre óbitos e sobreviventes (figura 17C), o perfil microbiológico e a diversidade microbiana observados não diferiram significativamente entre esses dois grupos, contra-argumentando a ideia da ocorrência de translocação como fator de agravamento na infecção pelo YFV.

Nesse sentido, como forma de melhor explorar os resultados observados para a α -diversidade (figura 17C, óbitos vs sobreviventes), além de observar como os marcadores se correlacionam, uma análise de correlação com os marcadores de translocação microbiana, bem como com variáveis clínicas, foi realizada (figura 18A). Interessante notar a correlação positiva entre os marcadores sCD14 e LBP (figura 18A, $Rho = 0.44$, $p < 0.05$), os quais participam em conjunto do processo de ativação de TLR-4 frente ao LPS (173). Adicionalmente, correlações positivas foram observadas entre MELD score e sCD14 (figura 18A, $Rho = 0.24$, $p < 0.05$), LBP (figura 18A, $Rho = 0.41$, $p < 0.05$), I-FABP (figura 18A, $Rho = 0.41$, $p < 0.05$) e neutrófilos (figura 18A, $Rho = 0.42$, $p < 0.05$), sugerindo o comprometimento do eixo gastro-hepático, importante barreira contra produtos microbianos translocados, com elevação de marcadores associados à translocação microbiana.

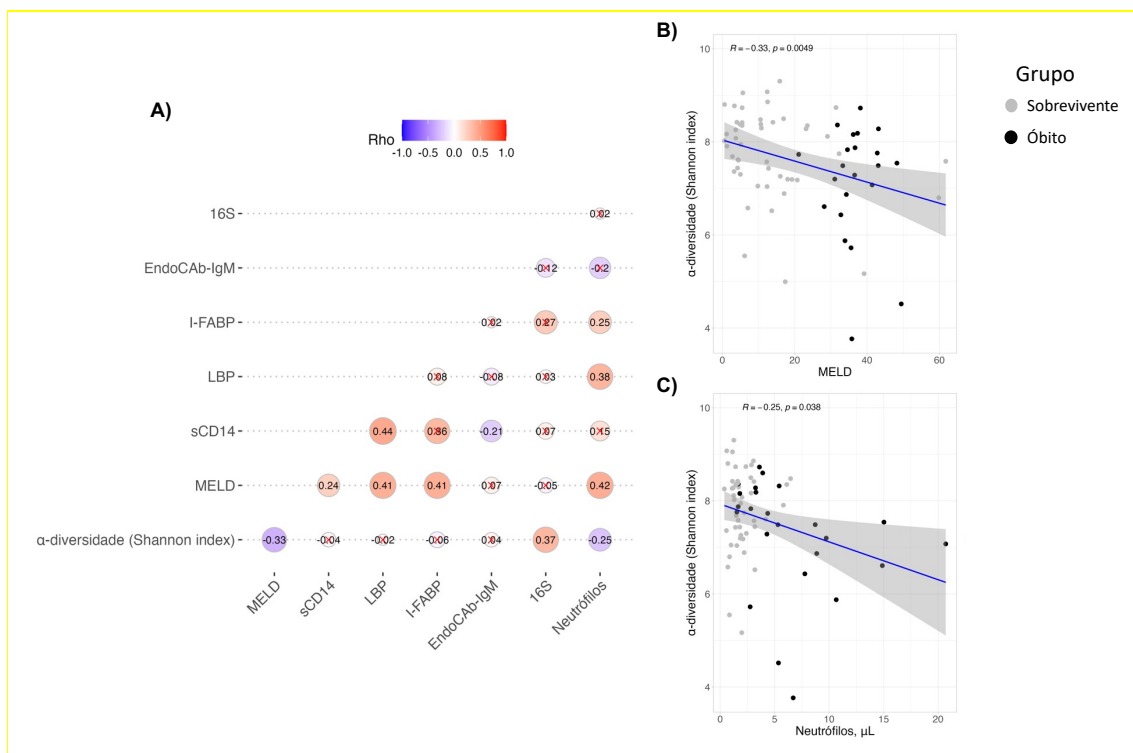


Figura 18. Análise de correlação da α-diversidade com marcadores de translocação microbiana.

NOTA: Em **A)**, matriz de correlação de Spearman entre marcadores de translocação microbiana e α-diversidade; em **B)**, correlação de Spearman entre α-diversidade e MELD score, esferas cinzas e pretas representando os grupos Sobrevivente e Óbito, respectivamente; em **C)**, correlação de Spearman entre α-diversidade e neutrófilos, esferas cinzas e pretas representando os grupos Sobrevivente e Óbito, respectivamente. Em **A)**, utilizados dados dos 90 pacientes infectados e na fase aguda (63 sobreviventes, 27 óbitos), exceto para correlações com a α-diversidade, com um $n = 78$ (53 sobreviventes, 25 óbitos), mesmo número amostral representado em **B)** e **C)**.

Correlações negativas, ainda que pequenas, foram observadas entre a α-diversidade com a contagem de neutrófilos em sangue periférico e o MELD score, duas variáveis clínicas associadas à gravidade na infecção pelo YFV (figuras 18B, C) (64,78), sugerindo que o comprometimento de barreiras biológicas contra produtos microbianos favorece a translocação desses produtos para a circulação, com redução na diversidade bacteriana, sendo esta mais proeminente conforme a gravidade do quadro (figura 17C). Por fim, ainda é válido notar que houve correlação positiva entre a α-diversidade e o número de cópias de 16S, sugerindo que o aumento da diversidade observado nos indivíduos infectados pelo YFV em relação aos controles não infectados (dados não mostrados) pode ser devido ao aumento na riqueza de microrganismos.

É importante pontuar que, apesar da falta de informação sobre o impacto da diversidade microbiana no sistema circulatório, alterações na α-diversidade tem sido

observadas de acordo com o perfil de resposta imune e grau de gravidade em diferentes condições patológicas (128,144,145,184). Em trabalho conduzido por Zhang e colaboradores (2019), por exemplo, os autores observaram uma redução na α -diversidade em pacientes cronicamente infectados pelo vírus da hepatite B e com falência hepática (144). Adicionalmente, Puri e colaboradores (2018), demonstraram que indivíduos com hepatite alcoólica grave apresentaram uma redução na α -diversidade (183). Neste trabalho os autores também utilizaram do valor de MELD para caracterizar os indivíduos com um quadro moderado ou grave de hepatite, reforçando a associação entre o grau de dano hepático e o desbalanço na diversidade microbiana sistêmica (183).

Por fim, a associação entre a α -diversidade e a contagem de neutrófilos em sangue periférico, reforça a ideia de que redução na diversidade microbiana se relaciona a quadros mais graves da infecção pelo YFV (64), além de estabelecer uma conexão entre o aumento de neutrófilos observado e a alteração na composição microbiana circulante desses indivíduos. Ainda assim, maiores esclarecimentos acerca do impacto da diversidade microbiana, bem como de sua relação com o agravo/atenuação da resposta imunológica ou desfecho clínico seriam obtidos a partir de uma análise integrada entre a composição microbiana, produção de citocinas e até mesmo metabólitos presentes nos pacientes infectados pelo YFV que sobreviveram e naqueles que foram à óbito (78,145).

4.4. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Nos últimos anos, com os surtos de FA ocorridos fora da região endêmica, estudos foram conduzidos com o objetivo de identificar fatores relacionados à gravidade nessa infecção, conhecimento ainda pouco explorado na literatura (64,65,189). Em um destes estudos, Kallas e colaboradores (2019), identificaram que a contagem de neutrófilos em sangue periférico foi um fator independentemente associado a mau prognóstico na infecção pelo YFV. Com base nestes achados e em resultados prévios, a possibilidade de ocorrência de translocação microbiana como fator de agravo na infecção pelo YFV foi postulada (64,107). Neste contexto, a pesquisa por marcadores plasmáticos direto e indiretos de translocação microbiana – sCD14, LBP, EndoCAb IgM, I-FABP e DNA 16S – foi realizada em amostras de pacientes infectados pelo YFV, na fase aguda (preferencialmente obtidas no momento de admissão hospitalar) e que sobreviveram ou foram à óbito durante o período de acompanhamento da coorte.

Comparado a amostras de pacientes obtidas na fase de convalescença, um aumento significativo de sCD14 e LBP foi observado nos grupos óbito e sobrevivente; ao analisar I-FABP, entretanto, a elevação deste marcador foi significativa apenas no grupo de pacientes que foram à óbito. Apesar da falta de significância estatística, pacientes que foram à óbito apresentaram um aumento de DNA 16S em relação aos demais grupos. Tais resultados demonstram que a elevação de sCD14 e LBP é mais sensível ao *status* da infecção do que ao desfecho clínico analisado. Neste aspecto, é importante ressaltar que outros fatores, como por exemplo o próprio agente infeccioso ou o grau de lesão hepática ou mesmo condição inflamatória, podem influenciar na alteração de tais marcadores (190,191). Por sua vez, o marcador de injúria intestinal I-FABP foi exclusivamente relacionado ao desfecho óbito.

De maneira interessante, o I-FABP demonstrou-se como um marcador de injúria intestinal nas fases iniciais da sepse e choque séptico, em que pacientes que foram a óbito (análise de desfecho em 28 dias) apresentaram níveis significativamente elevados comparado aos sobreviventes no momento de admissão em unidade de terapia intensiva (192,193). Ainda, uma correlação entre os níveis de I-FABP e a ocorrência de dano intestinal por processo isquêmico foi observada (192,193). Adicionalmente, a ocorrência de vasculopatia e lesão isquêmica, com comprometimento de órgãos irrigados pela circulação esplâncica foi demonstrada em indivíduos infectados pelo YFV submetidos a transplante hepático e que foram à óbito (63). Assim, considerando o momento de obtenção das amostras analisadas neste estudo, nossos resultados sugerem que os pacientes que evoluíram para óbito deram entrada no serviço hospitalar com comprometimento gastrointestinal, favorável ao processo de translocação microbiana.

A ocorrência de translocação microbiana como fator relacionado à extensa ativação imune e agravo é bem estudado na infecção pelo HIV (114). Adicionalmente, este mesmo fenômeno foi observado como fator de agravo na infecção pelo DENV (107). Em ambas as infecções, a possibilidade de replicação viral em células constituintes do sistema imune mucoso é um fator a se considerar para explicar o comprometimento intestinal (107,114). Já no contexto da FA, visto o caráter hepatotrópico do vírus e os resultados observados neste trabalho, a translocação microbiana pode ser explicada pelo rompimento do eixo gastro-hepático, com lesão hepática decorrente da ação viral e lesão intestinal isquêmica por intensa resposta inflamatória. Neste sentido, com base nos resultados observados neste trabalho em associação com a literatura científica e com

trabalhos publicados/em vias de publicação envolvendo os casos de infecção pelo YFV entre 2017-2018, um possível processo imunopatológico pode ser discutido (63,64,78,189,194) (figura 19).

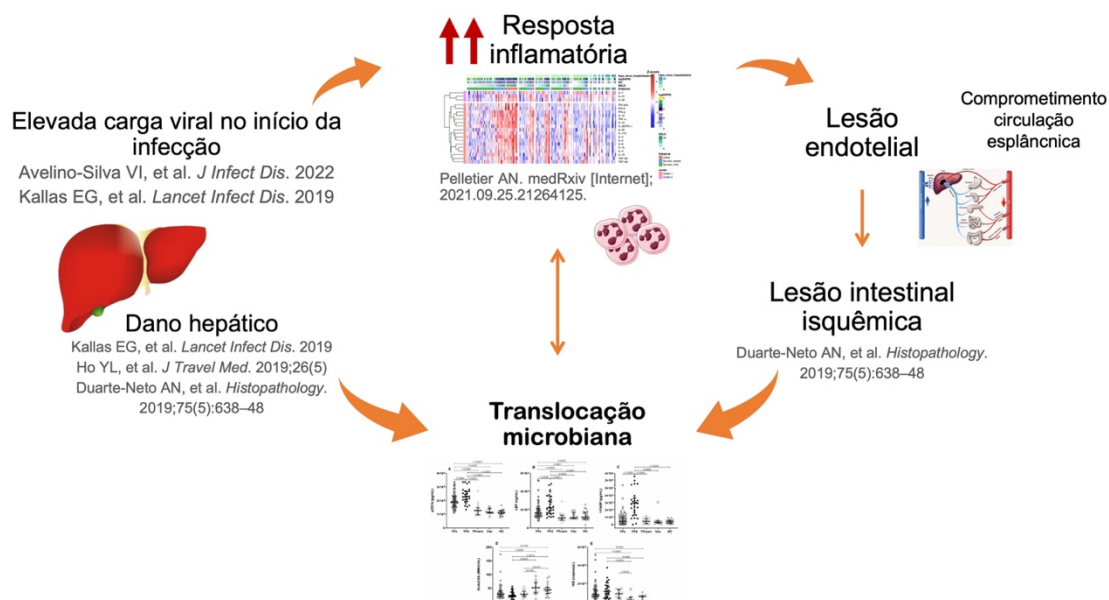


Figura 19. Esquemática do possível processo imunopatológico relacionado à gravidade na infecção pelo YFV.

NOTA: A ocorrência de uma carga viral elevada na fase aguda da infecção constitui fator preditor para óbito no curso clínico da febre amarela. É possível que a carga viral elevada promova maior dano hepático, visto o caráter hepatotrópico do YFV, reduzindo o papel hepático de barreira à entrada do LPS e favorecendo a ocorrência de translocação microbiana, além de aumentar a resposta pró-inflamatória. A translocação bacteriana, por sua vez, contribui para o aumento da resposta pró-inflamatória sistêmica, direcionando um perfil de resposta caracterizada pelo aumento de neutrófilos circulantes. A acentuação da resposta inflamatória sistêmica induz a ocorrência de lesão endotelial, com possível comprometimento de vasos da circulação esplâncnica e desenvolvimento de lesão isquêmica na mucosa intestinal, evidenciado pelo aumento do marcador I-FABP no grupo de indivíduos que evoluiu para óbito. O comprometimento da mucosa intestinal também contribui para a ocorrência de translocação bacteriana, constituindo um ciclo marcado por uma extensiva ativação imunológica na fase aguda e má evolução clínica.

Conforme demonstrado, a carga viral foi um fator preditor de óbito na infecção pelo YFV, com elevadas cargas no momento de admissão hospitalar que se sustentam elevadas até o momento do óbito (64,189). Como impacto de uma carga viral muito elevada, um maior comprometimento hepático pode ser observado, além de uma resposta pró-inflamatória elevada concomitante (78). Devido ao comprometimento hepático, a ocorrência de translocação microbiana é favorecida e os produtos translocados induzem acentuação da resposta pró-inflamatória, com geração de lesão endotelial, isquemia e

comprometimento da circulação esplâncnica, levando ao comprometimento intestinal e aumento da translocação microbiana (63,115,190). Adicionalmente, a elevada resposta pró-inflamatória também induz a ocorrência de coagulopatia sistêmica, conforme evidenciado por Bailey e colaboradores (2020) ao encontrar elevados valores de dímero-D em pacientes com FA, o que pode contribuir para a ocorrência de lesão isquêmica intestinal (194,195). Neste contexto, o desbalanço imune contribui para o não controle da carga viral e um sistema que se retroalimenta é estabelecido, com exacerbação da resposta inflamatória, indução de dano intestinal, translocação microbiana e exacerbação da resposta inflamatória (figura 19).

Por fim, é importante ressaltar a importância da resposta imune celular, inata e adaptativa, bem como adequada caracterização do perfil de citocinas e outros marcadores relevantes (metabólitos, por exemplo), para um melhor entendimento do processo imunopatológico que acompanha o desenvolvimento de quadros graves da infecção pelo YFV. A análise do microbioma intestinal também teria valor agregado, principalmente por permitir estabelecer uma relação direta entre o observado como microbioma intestinal e o perfil observado no plasma. Além disso, no que diz respeito à análise da translocação microbiana e seus mecanismos, a análise direta do tecido intestinal permitiria a observação de um potencial rompimento dessa barreira física, além da identificação de marcadores da resposta imune e até mesmo a presença ou não de partículas virais neste tecido.

5. CONCLUSÕES

Este trabalho propôs, como objetivo geral, analisar a ocorrência de translocação microbiana e sua associação com a neutrofilia em pacientes infectados com o YFV selvagem que sobreviveram e que foram à óbito na fase aguda da infecção. Ao final, as seguintes conclusões foram obtidas:

- A determinação NLR no momento de admissão demonstrou ser um marcador com interessante valor preditivo de casos mais graves no curso clínico da infecção natural;
- Funcionalmente, não houve diferença nos neutrófilos dos pacientes infectados pelo YFV e na fase aguda que sobreviveram e que foram à óbito, demonstrando que as alterações observadas na contagem celular de neutrófilos ocorreu por motivos independentes da função desta célula;
- Uma associação negativa foi observada entre o grau de comprometimento hepático, a contagem de neutrófilos e a diversidade bacteriana na fase aguda da infecção pelo YFV. Maiores investigações sobre as modulações envolvidas nesta associação são interessante alvo de novos estudos;
- Pacientes que evoluíram à óbito apresentaram maior dano hepático e intestinal, sugerindo o comprometimento do eixo gastro-hepático e a ocorrência de translocação microbiana, caracterizada pela alteração dos níveis de marcadores plasmáticos relacionados a este processo, em casos que evoluem para quadros mais graves da doença.

6. ANEXOS

ANEXO A – APROVAÇÃO DO ESTUDO NA PLATAFORMA BRASIL



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: INVESTIGAÇÃO DA NEUTROFILIA EM PACIENTES COM FEBRE AMARELA AGUDA

Pesquisador: Esper Georges Kallás

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06704819.8.0000.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.190.194

Apresentação do Projeto:

Projeto novo denominado: INVESTIGAÇÃO DA NEUTROFILIA EM PACIENTES COM FEBRE AMARELA AGUDA..

Objetivo da Pesquisa:

Este trabalho consistirá em um estudo do tipo coorte retrospectiva, pois as amostras já estão disponíveis. Serão utilizadas amostras de febre amarela criopreservadas e pertencentes ao projeto de pesquisa intitulado "Arboviroses no contexto da imunotivação crônica pelo HIV", desenvolvido pelo grupo de pesquisa do LIM-60. A autorização para uso de tais amostras com a finalidade de pesquisa foi previamente aprovada por meio da assinatura dos termos de consentimento dos pacientes e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP (Nº Processo CAPPesq 15477 e CAAE 59542216.3.1001.0068).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Objetivo geral: Investigar as causas da neutrofilia na fase aguda da febre amarela.

3.2 Objetivos específicos, • Determinar a presença de biomarcadores de quebra de barreira intestinal no plasma dos pacientes que foram a óbito e dos sobreviventes; • Determinar a presença de biomarcadores de translocação bacteriana no plasma dos pacientes que foram a óbito e dos sobreviventes; • Determinar a presença do gene da subunidade 16S ribossomal (16S rRNA) bacteriana no plasma dos pacientes que foram a óbito e dos sobreviventes; • Avaliar a associação entre as variáveis testadas e o desfecho clínico (sobrevivência ou óbito) dos pacientes.

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: 3.190.194

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Fazem parte desta coorte amostras de 76 pacientes, todas confirmadamente positivas para febre amarela por técnicas moleculares, sorológicas ou autópsia, coletadas entre os meses de janeiro a maio de 2018. Dos 76 pacientes envolvidos, 49 sobreviveram e 27 foram a óbito ao final do período.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados. Trata-se de Estudo retrospectivo, previamente aprovado em relação a obtenção das amostras.

Recomendações:

Aprovação

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há Inadequações.

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.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1270591.pdf	30/01/2019 12:01:34		Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto_HCdiretoria_Signed.pdf	30/01/2019 12:01:11	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Termo_de_compromisso.pdf	04/12/2018 15:44:09	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Resumo_projeto.pdf	04/12/2018 15:43:51	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Justificativa_utilizacao_das_amostras.pdf	04/12/2018 15:43:31	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Declaracao_uso_dados.pdf	04/12/2018 15:43:17	Esper Georges Kallás	Aceito

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



USP - HOSPITAL DAS
CLÍNICAS DA FACULDADE DE
MEDICINA DA UNIVERSIDADE



Continuação do Parecer: 3.190.194

Outros	Mat_Declaracao_custeio.pdf	04/12/2018 15:43:03	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Declaracao_compromisso_aluno.pdf	04/12/2018 15:42:45	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Declaracao_aprov_pais_origem.pdf	04/12/2018 15:42:28	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Carta_Irinei_Velasco.pdf	04/12/2018 15:42:14	Esper Georges Kallás	Aceito
Outros	Mat_Autorizacao_uso_Amostras.pdf	04/12/2018 15:42:02	Esper Georges Kallás	Aceito
Orçamento	Mat_Orcamento_Financeiro.pdf	04/12/2018 15:41:49	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Mat_Biorrepositorio.pdf	04/12/2018 15:41:14	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Mat_Declaracao_compromisso_pesquisador.pdf	04/12/2018 15:40:42	Esper Georges Kallás	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Mat_Declaracao_infraEstrutura.pdf	04/12/2018 15:40:26	Esper Georges Kallás	Aceito
Cronograma	Mat_Cronograma.pdf	04/12/2018 15:39:23	Esper Georges Kallás	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Mat_Dispenza_TCLE.pdf	04/12/2018 15:39:05	Esper Georges Kallás	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Mat_Projeto_Doutorado.docx	04/12/2018 15:38:50	Esper Georges Kallás	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 11 de Março de 2019

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: cappesq.adm@hc.fm.usp.br

7. REFERÊNCIAS

1. Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: A Molecular Perspective on the Introduction of Yellow Fever Virus into the Americas. *PLoS Pathog* [Internet]. 2007 [citado 23 de abril de 2019];3(5):e75.
2. Carter HR. Yellow Fever. An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin. *Yellow Fever: An Epidemiological and Historical Study of Its Place of Origin*. 1931;
3. Franco O. História da febre-amarela no Brasil. Em: História da febre-amarela no Brasil. Brasil. Divisao de Cooperaçao e Divulgaçao; 1976.
4. Reed W, Carroll JAS, Agramonte A. The etiology of yellow fever: an additional note. *J Am Med Assoc*. 1901;36(7):431–40.
5. Soper FL. The newer epidemiology of yellow fever. *Am J Public Health Nations Health*. 1937;27(1):1–14.
6. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA*. agosto de 2008;300(8):960–2.
7. Haddow AJ. Yellow fever in central Uganda, 1964 Part I. Historical introduction. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1965;59(4):436–40.
8. Haddow A. The Natural History of Yellow Fever in Africa. *Proceedings of the Royal Society of Edinburgh*. 1969;70(3):191–227.
9. Stokes A, Bauer JH, Hudson XP. Experimental transmission of yellow fever to laboratory animals. *American journal of tropical medicine*. 1928;8(2).
10. Stokes A, Bauer JH, Hudson NP. The transmission of yellow fever to macacus rhesus: preliminary note. *J Am Med Assoc* [Internet]. 28 de janeiro de 1928;90(4):253–4.
11. Bauer JH, Mahaffv AF. The Susceptibility of African Monkeys to Yellow Fever. *Am J Hyg*. 1930;12(1).
12. Theiler M, Downs WG. The arthropod-borne viruses of vertebrates. An account of the Rockefeller Foundation virus program, 1951-1970. The arthropod-borne viruses of vertebrates An account of The Rockefeller Foundation Virus Program, 1951-1970. 1973

13. Collins ND, Barrett ADT. Live Attenuated Yellow Fever 17D Vaccine: A Legacy Vaccine Still Controlling Outbreaks in Modern Day. *Curr Infect Dis Rep* [Internet]. março de 2017;19(3):14.
14. Theiler M, Smith HH. The use of yellow fever virus modified by in vitro cultivation for human immunization. *Journal of Experimental Medicine*. 1937;65(6):787–800.
15. Rice CM, Lenches EM, Eddy SR, Shin SJ, Sheets RL, Strauss JH. Nucleotide sequence of yellow fever virus: implications for flavivirus gene expression and evolution. *Science*. agosto de 1985;229(4715):726–33.
16. Pulendran B. Learning immunology from the yellow fever vaccine: innate immunity to systems vaccinology. Vol. 9, *Nature reviews. Immunology*. England; 2009. p. 741–7.
17. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol*. março de 2015; 64:160–73.
18. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med*. março de 2010;30(1):237–60.
19. Chambers TJ, Hahn CS, Galler R, Rice CM. Flavivirus genome organization, expression, and replication. *Annu Rev Microbiol*. 1990; 44:649–88.
20. Lindenbach BD, Rice CM. Molecular biology of flaviviruses. *Adv Virus Res*. 2003; 59:23–61.
21. Barrows NJ, Campos RK, Liao KC, Prasanth KR, Soto-Acosta R, Yeh SC, et al. Biochemistry and Molecular Biology of Flaviviruses. *Chem Rev*. abril de 2018;118(8):4448–82.
22. Fernandez-Garcia MD, Mazzon M, Jacobs M, Amara A. Pathogenesis of flavivirus infections: using and abusing the host cell. *Cell Host Microbe*. abril de 2009;5(4):318–28.
23. Mutebi JP, Wang H, Li L, Bryant JE, Barrett AD. Phylogenetic and evolutionary relationships among yellow fever virus isolates in Africa. *J Virol* [Internet]. agosto de 2001;75(15):6999–7008.
24. de Souza RP, Foster PG, Sallum MAM, Coimbra TLM, Maeda AY, Silveira VR, et al. Detection of a new yellow fever virus lineage within the South American genotype I in Brazil. *J Med Virol*. janeiro de 2010;82(1):175–85.

25. Vasconcelos PFC, Bryant JE, da Rosa TPA, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett ADT. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerg Infect Dis*. setembro de 2004;10(9):1578–84.
26. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenco-de-Oliveira R, Vicente AC, Bello G. Phylodynamics of Yellow Fever Virus in the Americas: new insights into the origin of the 2017 Brazilian outbreak. *Sci Rep*. agosto de 2017;7(1):7385.
27. Bonaldo MC, Gómez MM, dos Santos AAC, Abreu FVS de, Ferreira-de-Brito A, Miranda RM de, et al. Genome analysis of yellow fever virus of the ongoing outbreak in Brazil reveals polymorphisms. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2017;112(6):447–51.
28. Gómez MM, de Abreu FVS, dos Santos AAC, de Mello IS, Santos MP, Ribeiro IP, et al. Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016–2017 Brazilian outbreak. *Journal of General Virology*. 1º de abril de 2018;99(4):536–48.
29. Vasconcelos PF da C. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003;36(2):275–93.
30. Brasil M da S. Febre Amarela. Guia para profissionais de saúde [Internet]. 2018. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs100/pt/>
31. Monath TP. Yellow fever: Victor, Victoria? Conqueror, conquest? *Epidemics and research in the last forty years and prospects for the future*. *Am J Trop Med Hyg*. julho de 1991;45(1):1–43.
32. Nasidi A, Monath TP, DeCock K, Tomori O, Cordellier R, Olaleye OD, et al. Urban yellow fever epidemic in western Nigeria, 1987. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 1989;83(3):401–6.
33. Garske T, van Kerkhove MD, Yactayo S, Ronveaux O, Lewis RF, Staples JE, et al. Yellow Fever in Africa: estimating the burden of disease and impact of mass vaccination from outbreak and serological data. *PLoS Med* [Internet]. 6 de maio de 2014;11(5):e1001638–e1001638.
34. Kraemer MUGG, Faria NR, Reiner RC, Golding N, Nikolay B, Stasse S, et al. Spread of yellow fever virus outbreak in Angola and the Democratic Republic of the Congo 2015–16: a modelling study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1º de março de 2017 [citado 14 de junho de 2020];17(3):330–8.

35. WHO WHO. Eliminate yellow fever epidemics [Internet]. 2017. Disponível em: www.who.int/csr/disease/yellowfev/en
36. Pinheiro FP, Travassos da Rosa AP, Moraes MA, Almeida Neto JC, Camargo S, Filgueiras JP. An epidemic of yellow fever in central Brazil. 1972-1973. I. Epidemiological studies. *Am J Trop Med Hyg.* janeiro de 1978;27(1 Pt 1):125–32.
37. Vasconcelos PF, Rosa AP, Rodrigues SG, Rosa ES, Monteiro HA, Cruz AC, et al. Yellow fever in Para State, Amazon region of Brazil, 1998-1999: entomologic and epidemiologic findings. *Emerg Infect Dis.* 2001;7(3 Suppl):565–9.
38. Vasconcelos PF, Costa ZG, Travassos Da Rosa ES, Luna E, Rodrigues SG, Barros VL, et al. Epidemic of jungle yellow fever in Brazil, 2000: implications of climatic alterations in disease spread. *J Med Virol.* novembro de 2001;65(3):598–604.
39. Tuboi SH, Costa ZGA, da Costa Vasconcelos PF, Hatch D. Clinical and epidemiological characteristics of yellow fever in Brazil: analysis of reported cases 1998-2002. *Trans R Soc Trop Med Hyg.* fevereiro de 2007;101(2):169–75.
40. Araújo FAA, Ramos DG, Santos AL, Passos PH de O, Elkhoury ANSM, Costa ZGA, et al. Epizootias em primatas não humanos durante reemergência do vírus da febre amarela no Brasil, 2007 a 2009. *Epidemiologia e Serviços de Saúde.* 2011;20(4):527–36.
41. Romano APM, Costa ZGA, Ramos DG, Andrade MA, Jayme V de S, Almeida MAB de, et al. Yellow Fever outbreaks in unvaccinated populations, Brazil, 2008-2009. *PLoS Negl Trop Dis.* março de 2014;8(3): e2740.
42. Ministério da Saúde (BR). Informe N°27 - Monitoramento do Período Sazonal da Febre Amarela, Brasil 2017/2018. 2018.
43. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, de Jesus JG, Aguiar RS, Iani FCM, et al. Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science* (1979). 31 de agosto de 2018;361(6405):894–9.
44. Moreira-Soto A, Torres MC, Lima de Mendonca MC, Mares-Guia MA, dos Santos Rodrigues CD, Fabri AA, et al. Evidence for multiple sylvatic transmission cycles during the 2016-2017 yellow fever virus outbreak, Brazil. *Clin Microbiol Infect.* fevereiro de 2018;
45. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Boletim epidemiológico Febre Amarela - 17/07/2018 [Internet]. 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/febre-tifoide/11263-situacao-epidemiologica-dados>

46. Secretaria de Estado da Saúde (SP). Boletim epidemiológico da febre amarela - 18/11/2019. 2019.
47. Ministério da Saúde (BR). Informe N°01 - Monitoramento do período sazonal da Febre Amarela Brasil 2017/2018 [Internet]. 2018. Disponível em: <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/janeiro/28/informe-FA-n.3-21jan19.pdf>
48. Monath TP. Yellow fever vaccine. *Expert Rev Vaccines*. agosto de 2005;4(4):553–74.
49. Barrett ADT, Teuwen DE. Yellow fever vaccine - how does it work and why do rare cases of serious adverse events take place? *Curr Opin Immunol*. junho de 2009;21(3):308–13.
50. World Health Organization (WHO). Vaccines and vaccination against yellow fever: WHO Position Paper, June 2013 - recommendations. Vol. 33, Vaccine. Netherlands; 2014 jan.
51. de Noronha TG, de Lourdes de Sousa Maia M, Geraldo Leite Ribeiro J, Campos Lemos JA, Maria Barbosa de Lima S, Martins-Filho OA, et al. Duration of post-vaccination humoral immunity against yellow fever in children. *Vaccine* [Internet]. 2019;37(48):7147–54.
52. Campi-Azevedo AC, Reis LR, Peruhype-Magalhães V, Coelho-dos-Reis JG, Antonelli LR, Fonseca CT, et al. Short-Lived Immunity After 17DD Yellow Fever Single Dose Indicates That Booster Vaccination May Be Required to Guarantee Protective Immunity in Children. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10.
53. Domingo C, Fraissinet J, Ansah PO, Kelly C, Bhat N, Sow SO, et al. Long-term immunity against yellow fever in children vaccinated during infancy: a longitudinal cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1º de dezembro de 2019;19(12):1363–70.
54. Vasconcelos PFC, Barrett ADT. Are booster doses of yellow fever vaccine needed? *Lancet Infect Dis* [Internet]. 1º de dezembro de 2019;19(12):1275–6.
55. Ministério da Saúde (BR). Calendário nacional de vacinação: vacinas para criança [Internet]. página da web. 2022 [citado 11 de fevereiro de 2023]. Disponível em: https://www.gov.br/saude/pt-br/assuntos/saude-de-a-a-z/c/calendario-nacional-de-vacinacao/calendario-vacinal-2022/anexo-calendario-de-vacinacao-da-crianca_atualizado_-final-20-09-2022.pdf

56. Gerhardt CMB, Castro APBM, Pastorino AC, Dorna M de B, Nunes-Santos C de J, Aquilante BP, et al. Safety of yellow fever vaccine administration in confirmed egg-allergic patients. *Vaccine* [Internet]. 2020;38(42):6539–44.
57. WHO WHO. Yellow fever vaccine: WHO position on the use of fractional doses - June 2017. Vol. 92. 2017.
58. Campi-Azevedo AC, de Almeida Estevam P, Coelho-Dos-Reis JG, Peruhype-Magalhães V, Villela-Rezende G, Quaresma PF, et al. Subdoses of 17DD yellow fever vaccine elicit equivalent virological/immunological kinetics timeline. *BMC Infect Dis*. julho de 2014;14:391.
59. Shearer FM, Moyes CL, Pigott DM, Brady OJ, Marinho F, Deshpande A, et al. Global yellow fever vaccination coverage from 1970 to 2016: an adjusted retrospective analysis. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(11).
60. Monath TP, Barrett AD. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. *Adv Virus Res*. 2003;60:343–95.
61. Ribeiro AF, Cavalin RF, Suleiman JMAH, da Costa JA, de Vasconcelos MJ, Málaque CMSA, et al. Yellow fever: Factors associated with death in a hospital of reference in infectious diseases, São Paulo, Brazil, 2018. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene*. 28 de maio de 2019;101(1):180–8.
62. 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* [Internet]. setembro de 2013 [citado 23 de abril de 2019];23(5):305–18.
63. Duarte-Neto AN, Cunha M dos P, 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* [Internet]. 1º de novembro de 2019;75(5):638–48.
64. Kallas EG, D'Elia Zanella LGFAB, Moreira CH v, Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, et al. Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis* [Internet]. 17 de maio de 2019
65. 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]. 31 de maio de 2019;26(5).

66. Smithburn KC, Mahaffy AF. Immunization Against Yellow Fever: Studies on the Time of Development and the Duration of Induced Immunity. *The American Journal of Tropical Medicine* [Internet]. 1945;s1-25(3):217–23.
67. Bovay A, Fuertes Marraco SA, Speiser DE. Yellow fever virus vaccination: an emblematic model to elucidate robust human immune responses. *Hum Vaccin Immunother* [Internet]. 3 de agosto de 2021;17(8):2471–81.
68. Abbas AK, Lichtman AH, Pillai S. *Imunologia Celular e Molecular*. 8^a ed. Elsevier. 2015.
69. Marquardt N, Ivarsson MA, Blom K, Gonzalez VD, Braun M, Falconer K, et al. The Human NK Cell Response to Yellow Fever Virus 17D Is Primarily Governed by NK Cell Differentiation Independently of NK Cell Education. *The Journal of Immunology* [Internet]. 1^o de outubro de 2015;195(7):3262.
70. Muyanja E, Ssemaganda A, Ngauv P, Cubas R, Perrin H, Srinivasan D, et al. Immune activation alters cellular and humoral responses to yellow fever 17D vaccine. *J Clin Invest* [Internet]. 1^o de julho de 2014;124(7):3147–58.
71. Querec TD, Akondy RS, Lee EK, Cao W, Nakaya HI, Teuwen D, et al. Systems biology approach predicts immunogenicity of the yellow fever vaccine in humans. *Nat Immunol*. janeiro de 2009;10(1):116–25.
72. Querec T, Bennouna S, Alkan S, Laouar Y, Gorden K, Flavell R, et al. Yellow fever vaccine YF-17D activates multiple dendritic cell subsets via TLR2, 7, 8, and 9 to stimulate polyvalent immunity. *Journal of Experimental Medicine* [Internet]. 6 de fevereiro de 2006;203(2):413–24.
73. Staples JE, Barrett ADT, Wilder-Smith A, Hombach J. Review of data and knowledge gaps regarding yellow fever vaccine-induced immunity and duration of protection. *NPJ Vaccines* [Internet]. 2020;5(1):54.
74. Perdomo-Celis F, Salvato MS, Medina-Moreno S, Zapata JC. T-Cell Response to Viral Hemorrhagic Fevers. *Vaccines (Basel)*. janeiro de 2019;7(1).
75. 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*. fevereiro de 2007;101(2):161–8.
76. Mendes CCH, de Sousa JR, Olímpio FA, Falcão LFM, Carvalho MLG, da Costa Lopes J, et al. Th22 cytokines and yellow fever: Possible implications for the

- immunopathogenesis of human liver infection. *Cytokine* [Internet]. 2022;157:155924.
77. Carvalho MLG, Falcão LFM, Lopes J da C, Mendes CCH, Olímpio FA, Miranda VDSC, et al. Role of Th17 Cytokines in the Liver's Immune Response during Fatal Yellow Fever: Triggering Cell Damage Mechanisms. *Cells*. 1º de julho de 2022;11(13).
 78. Pelletier AN, Tomazella M, de Carvalho K, Nicolau A, Marmoratto M, Silveira C, et al. Yellow fever disease severity is driven by an acute cytokine storm modulated by an interplay between the human gut microbiome and the metabolome. *medRxiv* [Internet]; 2021.09.25.21264125.
 79. Ng LG, Ostuni R, Hidalgo A. Heterogeneity of neutrophils. *Nat Rev Immunol*. fevereiro de 2019;
 80. Nicolas-Avila JA, Adrover JM, Hidalgo A. Neutrophils in Homeostasis, Immunity, and Cancer. *Immunity*. janeiro de 2017;46(1):15–28.
 81. Borregaard N. Neutrophils, from marrow to microbes. *Immunity*. novembro de 2010;33(5):657–70.
 82. Amulic B, Cazalet C, Hayes GL, Metzler KD, Zychlinsky A. Neutrophil function: from mechanisms to disease. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:459–89.
 83. Nordenfelt P, Tapper H. Phagosome dynamics during phagocytosis by neutrophils. *J Leukoc Biol*. agosto de 2011;90(2):271–84.
 84. Brinkmann V, Reichard U, Goosmann C, Fauler B, Uhlemann Y, Weiss DS, et al. Neutrophil extracellular traps kill bacteria. *Science*. março de 2004;303(5663):1532–5.
 85. Burgener SS, Schroder K. Neutrophil Extracellular Traps in Host Defense. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. julho de 2020;12(7).
 86. Zhu L, Liu L, Zhang Y, Pu L, Liu J, Li X, et al. High Level of Neutrophil Extracellular Traps Correlates with Poor Prognosis of Severe Influenza A Infection. *J Infect Dis*. janeiro de 2018;217(3):428–37.
 87. Zuo Y, Yalavarthi S, Shi H, Gockman K, Zuo M, Madison JA, et al. Neutrophil extracellular traps in COVID-19. *JCI Insight*. junho de 2020;5(11).
 88. Silvestre-Roig C, Fridlender ZG, Glogauer M, Scapini P. Neutrophil Diversity in Health and Disease. *Trends Immunol* [Internet]. 3 de junho de 2019; Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.it.2019.04.012>

89. Mantovani A, Cassatella MA, Costantini C, Jaillon S. Neutrophils in the activation and regulation of innate and adaptive immunity. *Nat Rev Immunol*. julho de 2011;11(8):519–31.
90. Pillay J, Kamp VM, van Hoffen E, Visser T, Tak T, Lammers JW, et al. A subset of neutrophils in human systemic inflammation inhibits T cell responses through Mac-1. *J Clin Invest*. janeiro de 2012;122(1):327–36.
91. Bowers NL, Helton ES, Huijbregts RPH, Goepfert PA, Heath SL, Hel Z. Immune suppression by neutrophils in HIV-1 infection: role of PD-L1/PD-1 pathway. *PLoS Pathog*. março de 2014;10(3):e1003993.
92. Moorlag SJCFM, Rodriguez-Rosales YA, Gillard J, Fanucchi S, Theunissen K, Novakovic B, et al. BCG Vaccination Induces Long-Term Functional Reprogramming of Human Neutrophils. *Cell Rep* [Internet]. 2020;33(7):108387.
93. Futosi K, Fodor S, Mocsai A. Neutrophil cell surface receptors and their intracellular signal transduction pathways. *Int Immunopharmacol*. novembro de 2013;17(3):638–50.
94. Li D, Wu M. Pattern recognition receptors in health and diseases. Vol. 6, Signal Transduction and Targeted Therapy. Springer Nature; 2021.
95. Ciesielska A, Matyjek M, Kwiatkowska K. TLR4 and CD14 trafficking and its influence on LPS-induced pro-inflammatory signaling. *Cellular and Molecular Life Sciences* [Internet]. 2021;78(4):1233–61.
96. Wagner C, Deppisch R, Deneffle B, Hug F, Andrassy K, Hänsch GM. Expression Patterns of the Lipopolysaccharide Receptor CD14, and the FC γ Receptors CD16 and CD64 on Polymorphonuclear Neutrophils: Data from Patients with Severe Bacterial Infections and Lipopolysaccharide-Exposed Cells. *Shock* [Internet]. 2003;19(1).
97. Wagner C, Iking-Konert C, Hug F, Stegmaier S, Heppert V, Wentzensen A, et al. Cellular inflammatory response to persistent localized *Staphylococcus aureus* infection: phenotypical and functional characterization of polymorphonuclear neutrophils (PMN). *Clin Exp Immunol* [Internet]. janeiro de 2006;143(1):70–7.
98. Gomes NE, Brunialti MKC, Mendes ME, Freudenberg M, Galanos C, Salomão R. Lipopolysaccharide-induced expression of cell surface receptors and cell activation of neutrophils and monocytes in whole human blood. Vol. 43, *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* . scielo ; 2010. p. 853–8.

99. Lakschevitz FS, Hassanpour S, Rubin A, Fine N, Sun C, Glogauer M. Identification of neutrophil surface marker changes in health and inflammation using high-throughput screening flow cytometry. *Exp Cell Res.* março de 2016;342(2):200–9.
100. Schmidt T, Zundorf J, Gruger T, Brandenburg K, Reiners AL, Zinserling J, et al. CD66b overexpression and homotypic aggregation of human peripheral blood neutrophils after activation by a gram-positive stimulus. *J Leukoc Biol.* maio de 2012;91(5):791–802.
101. Pauksens K, Fjaertoft G, Douhan-Hakansson L, Venge P. Neutrophil and monocyte receptor expression in uncomplicated and complicated influenza A infection with pneumonia. *Scand J Infect Dis.* 2008;40(4):326–37.
102. Pillay J, Ramakers BP, Kamp VM, Loi ALT, Lam SW, Hietbrink F, et al. Functional heterogeneity and differential priming of circulating neutrophils in human experimental endotoxemia. *J Leukoc Biol.* julho de 2010;88(1):211–20.
103. Wang Y, Jönsson F. Expression, Role, and Regulation of Neutrophil Fcγ Receptors. *Front Immunol* [Internet]. 2019;10.
104. van Grinsven E, Textor J, Hustin LSP, Wolf K, Koenderman L, Vrisekoop N. Immature Neutrophils Released in Acute Inflammation Exhibit Efficient Migration despite Incomplete Segmentation of the Nucleus. *The Journal of Immunology* [Internet]. 1º de janeiro de 2019;202(1):207 LP – 217.
105. Opasawatchai A, Amornsupawat P, Jiravejchakul N, Chan-In W, Spoerk NJ, Manopwisedjaroen K, et al. Neutrophil Activation and Early Features of NET Formation Are Associated with Dengue Virus Infection in Human. *Front Immunol.* 2019;9:3007.
106. Banerjee A, Shukla S, Pandey AD, Goswami S, Bandyopadhyay B, Ramachandran V, et al. RNA-Seq analysis of peripheral blood mononuclear cells reveals unique transcriptional signatures associated with disease progression in dengue patients. *Transl Res.* agosto de 2017;186:62-78.e9.
107. van de Weg CAM, Pannuti CS, de Araujo ESA, van den Ham HJ, Andeweg AC, Boas LS v, et al. Microbial translocation is associated with extensive immune activation in dengue virus infected patients with severe disease. *PLoS Negl Trop Dis.* 2013;7(5):e2236.

108. Lazar V, Ditu LM, Pircalabioru GG, Gheorghe I, Curutiu C, Holban AM, et al. Aspects of Gut Microbiota and Immune System Interactions in Infectious Diseases, Immunopathology, and Cancer [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Immunology*. 2018. p. 1830.
109. Turner JR. Intestinal mucosal barrier function in health and disease. *Nat Rev Immunol* [Internet]. 2009;9(11):799–809.
110. Brenchley JM, Douek DC. Microbial translocation across the GI tract. *Annu Rev Immunol*. 2012;30:149–73.
111. Sandler NG, Douek DC. Microbial translocation in HIV infection: causes, consequences and treatment opportunities. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2012;10(9):655–66. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/nrmicro2848>
112. Wiest R, Lawson M, Geuking M. Pathological bacterial translocation in liver cirrhosis. *J Hepatol*. 1º de janeiro de 2014;60(1):197–209.
113. Konturek PC, Harsch IA, Konturek K, Schink M, Konturek T, Neurath MF, et al. Gut–Liver Axis: How Do Gut Bacteria Influence the Liver? *Med Sci (Basel)* [Internet]. 17 de setembro de 2018;6(3):79. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30227645>
114. Brenchley JM, Price DA, Schacker TW, Asher TE, Silvestri G, Rao S, et al. Microbial translocation is a cause of systemic immune activation in chronic HIV infection. *Nat Med*. dezembro de 2006;12(12):1365–71.
115. Maleki KT, García M, Iglesias A, Alonso D, Ciancaglini M, Hammar U, et al. Serum Markers Associated with Severity and Outcome of Hantavirus Pulmonary Syndrome. *J Infect Dis*. maio de 2019;219(11):1832–40.
116. L SM, Ruth N, Dibyadyuti D, Caitlin B, B VCP, O OR, et al. Intestinal Injury Biomarkers Predict Mortality in Pediatric Severe Malaria. *mBio* [Internet]. 7 de setembro de 2022;13(5):e01325-22.
117. Lee CC, Avalos AM, Ploegh HL. Accessory molecules for Toll-like receptors and their function. *Nat Rev Immunol*. fevereiro de 2012;12(3):168–79.
118. Tsukamoto H, Takeuchi S, Kubota K, Kobayashi Y, Kozakai S, Ukai I, et al. Lipopolysaccharide (LPS)-binding protein stimulates CD14-dependent Toll-like receptor 4 internalization and LPS-induced TBK1-IKK-IRF3 axis activation. *J Biol Chem*. junho de 2018;293(26):10186–201.

119. Cohen IR, Norins LC. Natural human antibodies to gram-negative bacteria: immunoglobulins G, A, and M. *Science*. maio de 1966;152(3726):1257–9.
120. Strutz F, Heller G, Krasemann K, Krone B, Muller GA. Relationship of antibodies to endotoxin core to mortality in medical patients with sepsis syndrome. *Intensive Care Med*. maio de 1999;25(5):435–44.
121. Pelsers MMAL, Hermens WT, Glatz JFC. Fatty acid-binding proteins as plasma markers of tissue injury. *Clin Chim Acta*. fevereiro de 2005;352(1–2):15–35.
122. Kelly CJ, Colgan SP, Frank DN. Of Microbes and Meals: The Health Consequences of Dietary Endotoxemia. *Nutrition in Clinical Practice* [Internet]. 1º de abril de 2012;27(2):215–25.
123. Kitchens RL, Thompson PA. Modulatory effects of sCD14 and LBP on LPS-host cell interactions. *J Endotoxin Res*. 2005;11(4):225–9.
124. Tudesq JJ, Dunyach-Remy C, Combescure C, Doncesco R, Laureillard D, Lavigne JP, et al. Microbial translocation is correlated with HIV evolution in HIV-HCV co-infected patients. *PLoS One*. 2017;12(9):e0183372.
125. Jiang W, Lederman MM, Hunt P, Sieg SF, Haley K, Rodriguez B, et al. Plasma levels of bacterial DNA correlate with immune activation and the magnitude of immune restoration in persons with antiretroviral-treated HIV infection. *J Infect Dis*. abril de 2009;199(8):1177–85.
126. Mohammad S, Thiemermann C. Role of Metabolic Endotoxemia in Systemic Inflammation and Potential Interventions. *Front Immunol* [Internet]. 2021;11.
127. Wong J, Zhang Y, Patidar A, Vilar E, Finkelman M, Farrington K. Is Endotoxemia in Stable Hemodialysis Patients an Artefact? Limitations of the Limulus Amebocyte Lysate Assay and Role of (1→3)-β-D Glucan. *PLoS One* [Internet]. 20 de outubro de 2016;11(10):e0164978-.
128. Xu W, Luo Z, Alekseyenko A v, Martin L, Wan Z, Ling B, et al. Distinct systemic microbiome and microbial translocation are associated with plasma level of anti-CD4 autoantibody in HIV infection. *Sci Rep* [Internet]. 2018;8(1):12863.
129. Cox MJ, Cookson WOCM, Moffatt MF. Sequencing the human microbiome in health and disease. *Hum Mol Genet* [Internet]. 15 de outubro de 2013;22(R1):R88–94.

130. Nomura J, Rieg G, Bluestone G, Tsai T, Lai A, Terashita D, et al. Rapid detection of invasive *Mycobacterium chimaera* disease via a novel plasma-based next-generation sequencing test. *BMC Infect Dis.* maio de 2019;19(1):371.
131. Blauwkamp TA, Thair S, Rosen MJ, Blair L, Lindner MS, Vilfan ID, et al. Analytical and clinical validation of a microbial cell-free DNA sequencing test for infectious disease. *Nat Microbiol.* fevereiro de 2019;
132. Allaband C, McDonald D, Vázquez-Baeza Y, Minich JJ, Tripathi A, Brenner DA, et al. Microbiome 101: Studying, Analyzing, and Interpreting Gut Microbiome Data for Clinicians. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* [Internet]. 1º de janeiro de 2019 [citado 14 de julho de 2019];17(2):218–30.
133. Borges LGDA, Giongo A, Pereira L de M, Trindade FJ, Gregianini TS, Campos FS, et al. Comparison of the nasopharynx microbiome between influenza and non-influenza cases of severe acute respiratory infections: A pilot study. *Health Sci Rep.* junho de 2018;1(6):e47.
134. Hayashi T, Yamashita T, Watanabe H, Kami K, Yoshida N, Tabata T, et al. Gut Microbiome and Plasma Microbiome-Related Metabolites in Patients With Decompensated and Compensated Heart Failure. *Circ J.* dezembro de 2018;83(1):182–92.
135. Lloyd-Price J, Arze C, Ananthakrishnan AN, Schirmer M, Avila-Pacheco J, Poon TW, et al. Multi-omics of the gut microbial ecosystem in inflammatory bowel diseases. *Nature* [Internet]. 2019;569(7758):655–62.
136. Lloyd-Price J, Abu-Ali G, Huttenhower C. The healthy human microbiome. *Genome Med* [Internet]. 2016;8(1):51.
137. Dekaboruah E, Suryavanshi MV, Chettri D, Verma AK. Human microbiome: an academic update on human body site specific surveillance and its possible role. *Arch Microbiol* [Internet]. 2020;202(8):2147–67.
138. Mitreva M. 8 - The Microbiome in Infectious Diseases. Em: Cohen J, Powderly WG, Opal SMBTID (Fourth E, organizadores. Elsevier; 2017. p. 68-74.e2.
139. Byrd AL, Belkaid Y, Segre JA. The human skin microbiome. *Nat Rev Microbiol* [Internet]. 2018;16(3):143–55.
140. Luz Calle M. Statistical analysis of metagenomics data. Vol. 17, Genomics and Informatics. Korea Genome Organization; 2019.

141. Paisse S, Valle C, Servant F, Courtney M, Burcelin R, Amar J, et al. Comprehensive description of blood microbiome from healthy donors assessed by 16S targeted metagenomic sequencing. *Transfusion (Paris)*. maio de 2016;56(5):1138–47.
142. Whittle E, Leonard MO, Harrison R, Gant TW, Tonge DP. Multi-Method Characterization of the Human Circulating Microbiome. *Front Microbiol*. 2018;9:3266.
143. Castillo DJ, Rifkin RF, Cowan DA, Potgieter M. The Healthy Human Blood Microbiome: Fact or Fiction? [Internet]. Vol. 9, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2019. p. 148.
144. Zhang Y, Zhao R, Shi D, Sun S, Ren H, Zhao H, et al. Characterization of the circulating microbiome in acute-on-chronic liver failure associated with hepatitis B. *Liver Int*. março de 2019;
145. Nganou-Makamdop K, Talla A, Sharma AA, Darko S, Ransier A, Laboune F, et al. Translocated microbiome composition determines immunological outcome in treated HIV infection. *Cell* [Internet]. 2021;184(15):3899-3914.e16.
146. Morou A, Brunet-Ratnasingham E, Dubé M, Charlebois R, Mercier E, Darko S, et al. Altered differentiation is central to HIV-specific CD4⁺ T cell dysfunction in progressive disease. *Nat Immunol* [Internet]. 2019;20(8):1059–70.
147. Hunt PW, Sinclair E, Rodriguez B, Shive C, Clagett B, Funderburg N, et al. Gut epithelial barrier dysfunction and innate immune activation predict mortality in treated HIV infection. *J Infect Dis*. outubro de 2014;210(8):1228–38.
148. van de Weg CAM, Koraka P, van Gorp ECM, Mairuhu ATA, Supriatna M, Soemantri A, et al. Lipopolysaccharide levels are elevated in dengue virus infected patients and correlate with disease severity. *J Clin Virol*. janeiro de 2012;53(1):38–42.
149. Liu CM, Aziz M, Kachur S, Hsueh PR, Huang YT, Keim P, et al. BactQuant: an enhanced broad-coverage bacterial quantitative real-time PCR assay. *BMC Microbiol* [Internet]. 17 de abril de 2012;12:56.
150. Watanabe N, Kryukov K, Nakagawa S, Takeuchi JS, Takeshita M, Kirimura Y, et al. Detection of pathogenic bacteria in the blood from sepsis patients using 16S rRNA gene amplicon sequencing analysis. *PLoS One* [Internet]. 15 de agosto de 2018;13(8):e0202049-.

151. Wang Y, Qian PY. Conservative Fragments in Bacterial 16S rRNA Genes and Primer Design for 16S Ribosomal DNA Amplicons in Metagenomic Studies. *PLoS One* [Internet]. 9 de outubro de 2009;4(10):e7401.
152. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Lozupone CA, Turnbaugh PJ, et al. Global patterns of 16S rRNA diversity at a depth of millions of sequences per sample. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 15 de março de 2011 [citado 14 de junho de 2021];108 Suppl 1(Supplement 1):4516–22.
153. Caporaso JG, Lauber CL, Walters WA, Berg-Lyons D, Huntley J, Fierer N, et al. Ultra-high-throughput microbial community analysis on the Illumina HiSeq and MiSeq platforms. *ISME J* [Internet]. 2012;6(8):1621–4.
154. Bolyen E, Rideout JR, Dillon MR, Bokulich NA, Abnet CC, Al-Ghalith GA, et al. Reproducible, interactive, scalable and extensible microbiome data science using QIIME 2. *Nat Biotechnol* [Internet]. 2019;37(8):852–7.
155. McMurdie PJ, Holmes S. phyloseq: An R Package for Reproducible Interactive Analysis and Graphics of Microbiome Census Data. *PLoS One* [Internet]. 22 de abril de 2013;8(4):e61217.
156. Callahan BJ, McMurdie PJ, Rosen MJ, Han AW, Johnson AJA, Holmes SP. DADA2: High-resolution sample inference from Illumina amplicon data. *Nat Methods* [Internet]. 2016;13(7):581–3.
157. Liu J, Li S, Liu J, Liang B, Wang X, Wang H, et al. Longitudinal characteristics of lymphocyte responses and cytokine profiles in the peripheral blood of SARS-CoV-2 infected patients. *EBioMedicine* [Internet]. 18 de abril de 2020;55:102763. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32361250>
158. Liu J, Liu Y, Xiang P, Pu L, Xiong H, Li C, et al. Neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts critical illness patients with 2019 coronavirus disease in the early stage. *J Transl Med* [Internet]. 20 de maio de 2020;18(1):206. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32434518>
159. Prozan L, Shusterman E, Ablin J, Mitelpunkt A, Weiss-Meilik A, Adler A, et al. Prognostic value of neutrophil-to-lymphocyte ratio in COVID-19 compared with Influenza and respiratory syncytial virus infection. *Sci Rep* [Internet]. 2021;11(1):21519.
160. Westerdijk K, Simons KS, Zegers M, Wever PC, Pickkers P, de Jager CPC. The value of the neutrophil-lymphocyte count ratio in the diagnosis of sepsis in patients

- admitted to the Intensive Care Unit: A retrospective cohort study. *PLoS One* [Internet]. 27 de fevereiro de 2019;14(2):e0212861.
161. Martins EC, Silveira L da F, Viegas K, Beck AD, Fioravanti Júnior G, Cremonese RV, et al. Neutrophil-lymphocyte ratio in the early diagnosis of sepsis in an intensive care unit: a case-control study TT - Razão neutrófilo-linfócito no diagnóstico precoce de sepse em unidade de terapia intensiva: um estudo de caso-controlado. *Rev Bras Ter Intensiva* [Internet]. 2019/03/21. 2019;31(1):64–70.
 162. Zhao C, Wei Y, Chen D, Jin J, Chen H. Prognostic value of an inflammatory biomarker-based clinical algorithm in septic patients in the emergency department: An observational study. *Int Immunopharmacol* [Internet]. 2020;80:106145.
 163. Ni J, Wang H, Li Y, Shu Y, Liu Y. Neutrophil to lymphocyte ratio (NLR) as a prognostic marker for in-hospital mortality of patients with sepsis: A secondary analysis based on a single-center, retrospective, cohort study. *Medicine* [Internet]. novembro de 2019;98(46):e18029–e18029.
 164. Palm NW, Medzhitov R. Not so fast: adaptive suppression of innate immunity. *Nat Med* [Internet]. outubro de 2007;13(10):1142–4.
 165. Kim KD, Zhao J, Auh S, Yang X, Du P, Tang H, et al. Adaptive immune cells temper initial innate responses. *Nat Med* [Internet]. 2007/09/23. outubro de 2007;13(10):1248–52. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17891146>
 166. Naoum PC, Naoum FA. Interpretação laboratorial do hemograma. São José do Rio Preto, Brazil. 2008.
 167. Daumas RP, Passos SRL, Oliveira RVC, Nogueira RMR, Georg I, Marzochi KBF, et al. Clinical and laboratory features that discriminate dengue from other febrile illnesses: a diagnostic accuracy study in Rio de Janeiro, Brazil. *BMC Infect Dis*. fevereiro de 2013;13:77.
 168. Rubio E, Alejo-Cancho I, Aylagas C, Camprubí D, Ferré R, Albarracín MR, et al. Diagnostic Value of Platelet and Leukocyte Counts in the Differential Diagnosis of Fever in the Returning Traveler. *Am J Trop Med Hyg*. fevereiro de 2019;100(2):470–5.
 169. Binh PT, Matheus S, Huong VTQ, Deparis X, Marechal V. Early clinical and biological features of severe clinical manifestations of dengue in Vietnamese adults. *Journal of Clinical Virology* [Internet]. 2009;45(4):276–80. Disponível em: <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1386653209001632>.

170. Lerman Y v, Kim M. Neutrophil migration under normal and sepsis conditions. *Cardiovasc Hematol Disord Drug Targets*. 2015;15(1):19–28.
171. Surbatovic M, Popovic N, Vojvodic D, Milosevic I, Acimovic G, Stojicic M, et al. Cytokine profile in severe Gram-positive and Gram-negative abdominal sepsis. *Sci Rep*. junho de 2015;5:11355.
172. Honda T, Uehara T, Matsumoto G, Arai S, Sugano M. Neutrophil left shift and white blood cell count as markers of bacterial infection. *Clinica Chimica Acta*. 1º de junho de 2016;457:46–53.
173. Tan Y, Kagan JC. A Cross-Disciplinary Perspective on the Innate Immune Responses to Bacterial Lipopolysaccharide. *Mol Cell* [Internet]. 2014;54(2):212–23.
174. Lin SM, Frevert CW, Kajikawa O, Wurfel MM, Ballman K, Mongovin S, et al. Differential regulation of membrane CD14 expression and endotoxin-tolerance in alveolar macrophages. *Am J Respir Cell Mol Biol*. agosto de 2004;31(2):162–70.
175. Marcos V, Latzin P, Hector A, Sonanini S, Hoffmann F, Lacher M, et al. Expression, regulation and clinical significance of soluble and membrane CD14 receptors in pediatric inflammatory lung diseases. *Respir Res*. março de 2010;11(1):32.
176. Chevalier MF, Petitjean G, Dunyach-Remy C, Didier C, Girard PM, Manea ME, et al. The Th17/Treg ratio, IL-1RA and sCD14 levels in primary HIV infection predict the T-cell activation set point in the absence of systemic microbial translocation. *PLoS Pathog*. 2013;9(6):e1003453.
177. Sandler NG, Wand H, Roque A, Law M, Nason MC, Nixon DE, et al. Plasma levels of soluble CD14 independently predict mortality in HIV infection. *J Infect Dis*. março de 2011;203(6):780–90.
178. Luo Z, Health SL, Li M, Yang H, Wu Y, Collins M, et al. Variation in blood microbial lipopolysaccharide (LPS) contributes to immune reconstitution in response to suppressive antiretroviral therapy in HIV. *EBioMedicine* [Internet]. 1º de junho de 2022;80.
179. Ferri E, Novati S, Casiraghi M, Sambri V, Genco F, Gulminetti R, et al. Plasma Levels of Bacterial DNA in HIV Infection: The Limits of Quantitative Polymerase Chain Reaction. *J Infect Dis* [Internet]. 1º de julho de 2010;202(1):176–7.

180. Fitzgerald F, Harris K, Doyle R, Alber D, Klein N. Short Communication: Evidence That Microbial Translocation Occurs in HIV-Infected Children in the United Kingdom. *AIDS Res Hum Retroviruses* [Internet]. 25 de agosto de 2013;29(12):1589–93.
181. Abad-Fernández M, Vallejo A, Hernández-Novoa B, Díaz L, Gutiérrez C, Madrid N, et al. Correlation Between Different Methods to Measure Microbial Translocation and Its Association With Immune Activation in Long-Term Suppressed HIV-1–Infected Individuals. *JAIDS Journal of Acquired Immune Deficiency Syndromes* [Internet]. 2013;64(2).
182. Lelouvier B, Servant F, Païssé S, Brunet AC, Benyahya S, Serino M, et al. Changes in blood microbiota profiles associated with liver fibrosis in obese patients: A pilot analysis. *Hepatology* [Internet]. 1º de dezembro de 2016;64(6):2015–27.
183. Puri P, Liangpunsakul S, Christensen JE, Shah VH, Kamath PS, Gores GJ, et al. The circulating microbiome signature and inferred functional metagenomics in alcoholic hepatitis. *Hepatology* [Internet]. 1º de abril de 2018;67(4):1284–302.
184. Li Q, Wang C, Tang C, Zhao X, He Q, Li J. Identification and Characterization of Blood and Neutrophil-Associated Microbiomes in Patients with Severe Acute Pancreatitis Using Next-Generation Sequencing [Internet]. Vol. 8, *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*. 2018. p. 5.
185. Andermann T, Antonelli A, Barrett RL, Silvestro D. Estimating Alpha, Beta, and Gamma Diversity Through Deep Learning. *Front Plant Sci* [Internet]. 2022;13.
186. Ali Z, Shahzadi I, Majeed A, Malik HMT, Waseem S, Ahmed I, et al. Comparative analysis of the serum microbiome of HIV infected individuals. *Genomics* [Internet]. 2021;113(6):4015–21.
187. Gedgaudas R, Bajaj JS, Skieceviciene J, Varkalaite G, Jurkeviciute G, Gelman S, et al. Circulating microbiome in patients with portal hypertension. *Gut Microbes* [Internet]. 2022;14(1):2029674.
188. Schierwagen R, Alvarez-Silva C, Madsen MSA, Kolbe CC, Meyer C, Thomas D, et al. Circulating microbiome in blood of different circulatory compartments. *Gut* [Internet]. 2019;68(3):578.
189. Avelino-Silva VI, Thomazella MV, Marmorato MP, Correia CA, Dias JZC, Maestri A, et al. Viral kinetics in sylvatic yellow fever cases. *J Infect Dis* [Internet]. 1º de novembro de 2022 [citado 17 de novembro de 2022].

190. Reid M, Ma Y, Scherzer R, Price JC, French AL, Huhn GD, et al. Contribution of Liver Fibrosis and Microbial Translocation to Immune Activation in Persons Infected with HIV and/or Hepatitis C Virus. *J Infect Dis.* março de 2018;217(8):1289–97.
191. Chen YY, Lien JM, Peng YS, Chen YC, Tian YC, Fang JT, et al. Lipopolysaccharide binding protein in cirrhotic patients with severe sepsis. *J Chin Med Assoc.* fevereiro de 2014;77(2):68–74.
192. Derikx JPM, Poeze M, van Bijnen AA, Buurman WA, Heineman E. Evidence for intestinal and liver epithelial cell injury in the early phase of sepsis. *Shock.* novembro de 2007;28(5):544–8.
193. Sekino M, Funaoka H, Sato S, Okada K, Inoue H, Yano R, et al. Intestinal fatty acid-binding protein level as a predictor of 28-day mortality and bowel ischemia in patients with septic shock: A preliminary study. *J Crit Care.* dezembro de 2017;42:92–100.
194. Bailey AL, Kang LI, de Assis Barros D'Elia Zanella LGF, Silveira CGT, Ho YL, Foquet L, et al. Consumptive coagulopathy of severe yellow fever occurs independently of hepatocellular tropism and massive hepatic injury. *Proc Natl Acad Sci U S A* [Internet]. 22 de dezembro de 2020 [citado 17 de novembro de 2022];117(51):32648–56.
195. Cardinale V, Capurso G, Ianiro G, Gasbarrini A, Arcidiacono PG, Alvaro D. Intestinal permeability changes with bacterial translocation as key events modulating systemic host immune response to SARS-CoV-2: A working hypothesis. *Digestive and Liver Disease* [Internet]. 2020;52(12):1383–9.

APÊNDICES

APÊNDICE A – RELAÇÃO DAS AMOSTRAS UTILIZADAS PARA ANÁLISE DE MARCADORES PLASMÁTICOS DE TRANSLOCAÇÃO MICROBIANA NA FASE AGUDA DA INFECCÃO PELO YF

ID paciente	Dia de início dos sintomas	Data de coleta da amostra utilizada no estudo	Dias de sintomas	Desfecho clínico	Momento da coleta
1002	5-Jan-18	11-Jan-18	7	Sobrevivente	Admissão
1003	7-Jan-18	11-Jan-18	5	Sobrevivente	Admissão
1004	6-Jan-18	11-Jan-18	6	Sobrevivente	Admissão
1005	8-Jan-18	11-Jan-18	4	Óbito	Admissão
1007	8-Jan-18	12-Jan-18	5	Sobrevivente	Admissão
1009	8-Jan-18	15-Jan-18	8	Sobrevivente	1º seguimento
1010	8-Jan-18	17-Jan-18	10	Sobrevivente	1º seguimento
1011	6-Jan-18	17-Jan-18	12	Sobrevivente	Admissão
1012	8-Jan-18	16-Jan-18	9	Sobrevivente	Admissão
1014	6-Jan-18	12-Jan-18	7	Sobrevivente	Admissão
1015	8-Jan-18	15-Jan-18	8	Sobrevivente	Admissão
1016	6-Jan-18	15-Jan-18	10	Sobrevivente	Admissão
1017	6-Jan-18	18-Jan-18	13	Sobrevivente	2º seguimento
1019	14-Jan-18	16-Jan-18	3	Sobrevivente	Admissão
1020	12-Jan-18	16-Jan-18	5	Óbito	Admissão
1022	14-Jan-18	19-Jan-18	6	Sobrevivente	1º seguimento
1023	15-Jan-18	24-Jan-18	10	Sobrevivente	2º seguimento
1024	13-Jan-18	19-Jan-18	7	Óbito	Admissão
1026	13-Jan-18	19-Jan-18	7	Óbito	Admissão
1027	14-Jan-18	23-Jan-18	10	Sobrevivente	Admissão
1029	16-Jan-18	19-Jan-18	4	Óbito	Admissão
1030	17-Jan-18	23-Jan-18	7	Óbito	1º seguimento
1031	13-Jan-18	19-Jan-18	7	Sobrevivente	Admissão
1032	17-Jan-18	29-Jan-18	13	Sobrevivente	2º seguimento
1033	12-Jan-18	23-Jan-18	12	Sobrevivente	Admissão
1034	16-Jan-18	23-Jan-18	8	Sobrevivente	Admissão
1036	18-Jan-18	23-Jan-18	6	Óbito	Admissão
1037	12-Jan-18	23-Jan-18	12	Óbito	Admissão
1039	17-Jan-18	23-Jan-18	7	Sobrevivente	Admissão
1041	15-Jan-18	24-Jan-18	10	Sobrevivente	Admissão
1042	19-Jan-18	29-Jan-18	11	Óbito	2º seguimento
1043	18-Jan-18	24-Jan-18	7	Óbito	Admissão
1045	27-Jan-18	30-Jan-18	4	Sobrevivente	Admissão
1046	23-Jan-18	1-Feb-18	10	Sobrevivente	Admissão
1047	27-Jan-18	1-Feb-18	6	Sobrevivente	Admissão
1050	25-Jan-18	2-Feb-18	9	Sobrevivente	Admissão
1051	22-Jan-18	29-Jan-18	8	Sobrevivente	Admissão

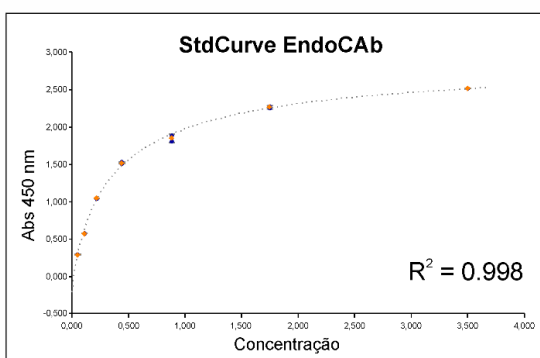
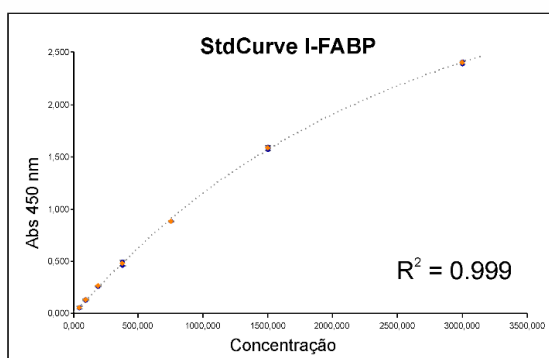
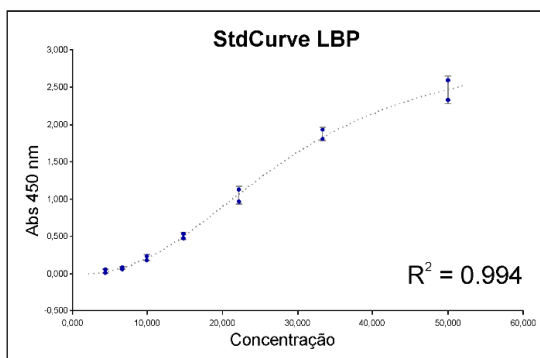
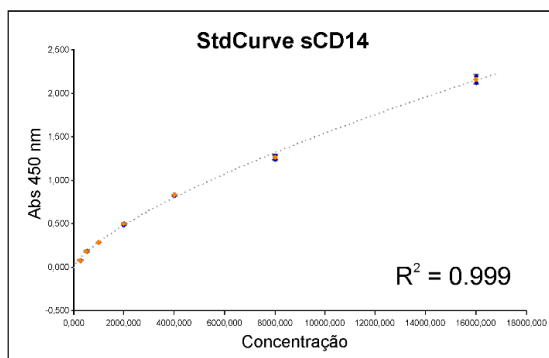
1052	22-Jan-18	29-Jan-18	8	Sobrevivente	Admissão
1053	23-Jan-18	30-Jan-18	8	Sobrevivente	Admissão
1054	22-Jan-18	31-Jan-18	10	Sobrevivente	1º seguimento
1057	11-Mar-18	20-Mar-18	10	Sobrevivente	Admissão
1059	26-Jan-18	5-Feb-18	11	Sobrevivente	Admissão
1061	26-Jan-18	7-Feb-18	13	Óbito	Admissão
1063	2-Feb-18	7-Feb-18	6	Óbito	Admissão
1065	1-Feb-18	7-Feb-18	7	Óbito	Admissão
1066	30-Jan-18	8-Feb-18	10	Óbito	Admissão
1068	14-Feb-18	26-Feb-18	13	Sobrevivente	2º seguimento
1069	14-Feb-18	21-Feb-18	8	Óbito	Admissão
1070	16-Feb-18	23-Feb-18	8	Óbito	1º seguimento
1073	8-Feb-18	23-Feb-18	16	Sobrevivente	Admissão
1074	23-Feb-18	27-Feb-18	5	Óbito	Admissão
1075	25-Feb-18	1-Mar-18	5	Óbito	Admissão
1076	25-Feb-18	2-Mar-18	6	Sobrevivente	Admissão
1078	21-Feb-18	1-Mar-18	9	Óbito	Admissão
1079	28-Feb-18	7-Mar-18	8	Óbito	Admissão
1080	26-Feb-18	8-Mar-18	11	Sobrevivente	1º seguimento
1081	28-Feb-18	6-Mar-18	7	Óbito	Admissão
1082	26-Feb-18	6-Mar-18	9	Óbito	Admissão
1083	2-Mar-18	14-Mar-18	13	Óbito	1º seguimento
1084	5-Mar-18	14-Mar-18	10	Sobrevivente	1º seguimento
1085	1-Mar-18	13-Mar-18	13	Sobrevivente	Admissão
1086	9-Mar-18	12-Mar-18	4	Óbito	Admissão
1087	20-Mar-18	29-Mar-18	10	Sobrevivente	Admissão
1088	22-Mar-18	29-Mar-18	8	Sobrevivente	Admissão
1089	23-Mar-18	29-Mar-19	7	Óbito	Admissão
1091	30-Mar-18	12-Apr-18	14	Sobrevivente	Admissão
1100	7-Jan-19	14-Jan-19	8	Sobrevivente	Admissão
1101	8-Jan-19	14-Jan-19	7	Sobrevivente	Admissão
1102	12-Jan-19	15-Jan-19	4	Sobrevivente	Admissão
1103	11-Jan-19	15-Jan-19	5	Óbito	Admissão
1104	13-Jan-19	17-Jan-19	5	Óbito	Admissão
1105	15-Jan-19	18-Jan-19	4	Sobrevivente	Admissão
1106	13-Jan-19	21-Jan-19	9	Sobrevivente	Admissão
1107	15-Jan-19	21-Jan-19	7	Sobrevivente	Admissão
1108	15-Jan-19	21-Jan-19	7	Sobrevivente	Admissão
1109	15-Jan-19	21-Jan-19	7	Sobrevivente	Admissão
1111	19-Jan-19	28-Jan-19	10	Sobrevivente	Admissão
1112	22-Jan-19	28-Jan-19	7	Sobrevivente	Admissão
1113	22-Jan-19	28-Jan-19	7	Sobrevivente	Admissão
1114	27-Jan-19	29-Jan-19	3	Sobrevivente	Admissão
1115	21-Jan-19	1-Feb-19	12	Sobrevivente	Admissão
1116	30-Jan-19	4-Feb-19	6	Sobrevivente	Admissão
1117	29-Jan-19	8-Feb-19	11	Sobrevivente	Admissão
1118	13-Feb-19	21-Feb-19	9	Sobrevivente	Admissão

1119	5-Feb-19	21-Feb-19	17	Sobrevivente	Admissão
1120	18-Feb-19	26-Feb-19	9	Sobrevivente	Admissão
1121	19-Feb-19	26-Feb-19	8	Sobrevivente	Admissão
1122	4-Mar-19	11-Mar-19	8	Sobrevivente	Admissão
1123	12-Mar-19	20-Mar-19	9	Sobrevivente	Admissão
1124	9-Mar-19	21-Mar-19	13	Sobrevivente	Admissão

APÊNDICE B – RELAÇÃO DE AMOSTRAS EXCLUÍDAS DESTE ESTUDO

ID paciente	Desfecho clínico	Motivo para exclusão
1006	Sobrevivente	Só disponível amostra em D30; fase de recuperação
1008	Sobrevivente	Só disponível amostra em D30; fase de recuperação
1018	Sobrevivente	Só disponível amostra em D30; fase de recuperação
1028	Óbito	Sem amostras de plasma na fase aguda disponível
1049	Sobrevivente	Sem amostras de plasma na fase aguda disponível
1055	Óbito	Sem amostras de plasma na fase aguda disponível
1071	Sobrevivente	Amostra de plasma disponível coletada em 26/02/2018. Paciente realizou plasmáfereze entre os dias 20/02 a 24/02/2018
1072	Sobrevivente	Só disponível amostra em D30; fase de recuperação
1095	Sobrevivente	Sem amostras de plasma na fase aguda disponível
1096	Sobrevivente	Sem amostras de plasma na fase aguda disponível

APÊNDICE C – CURVAS-PADRÃO OBTIDAS PARA DETERMINAÇÃO DAS CONCENTRAÇÕES DE SCD14, LBP, I-FABP E ENDOCAB IGM



APÊNDICE D – PROTOCOLO UTILIZADO PARA EXTRAÇÃO DE DNA PARA QUANTIFICAÇÃO DO GENE 16S E ENVIO À EMPRESA DE SEQUENCIAMENTO

EXTRAÇÃO DNA TOTAL QUANTIFICAÇÃO 16S E SEQUENCIAMENTO

Amostras de DNA extraído foram enviadas à empresa NeoProspecta para realização do sequenciamento 16S

Condições requeridas pela empresa:

- Material necessário: 5 ng/ μ L em 20-30 μ L
- Eluir em água ultra-pura ou tampão Tris 10mM pH 8-8.4 (não deve conter mais que 0,1 mM de EDTA no tampão)
- Enviar as amostras congeladas ao laboratório (precisam chegar sob refrigeração). Enviar em gelo seco.

** As amostras podem ser enviadas secas (a temperatura ambiente) com quantidade de DNA suficiente para 5 ng/ μ L ao ressuspender em 20-30 μ L

EXTRAÇÃO

Materiais e reagentes necessários:

- Reagentes fornecidos pelo kit de extração
- *Buffer* enzimático (requer preparo)
- Proteinase K
- Etanol 96-100%
- Microtubos de 1,5 mL
- Micropipetas 10 μ L, 20 μ L, 100 μ L, 200 μ L e 1000 μ L
- Ponteiras para as respectivas micropipetas utilizadas
- Centrífuga para microtubos

Preparo do *buffer* enzimático:

- 20 mM Tris-Cl pH 8
- 2mM EDTA
- 1,2% Triton x100
- Lisozima 20 mg/mL (estoque a 200 mg/mL)

O buffer enzimático foi previamente preparado e armazenado a 4°C sem a adição da lisozima. A adição desta enzima foi realizada no momento de execução do experimento. Para cada 10 mL de buffer enzimático final, utilizar 9 mL do *buffer* enzimático estocado + 1 mL da lisozima estoque (200 mg/mL).

PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO – DNEASY BLOOD AND TISSUE KIT (QIAGEN 69506) – PROPOSTA 1

1. Separar e numerar três microtubos para cada amostra;
2. Adicionar, no tubo nº 1, 500 µL de plasma e centrifugar a 5000 g por 10 minutos;
3. Após centrifugar, retirar 350 µL do sobrenadante e transferir para o microtubo nº 3. Com o restante do líquido, homogeneizar o *pellet* e transferir 100 µL dessa mistura para o tubo nº 2. (Os tubos nº 1 e 2 serão utilizados para otimizar a extração, favorecendo a recuperação de bactérias gram-positivas (nº 1) e gram-negativas (nº 2));
4. No tubo nº 1 adicionar 180 µL do *buffer* enzimático preparado (a lisozima deve ser adicionada no dia da extração e esse *buffer* não pode ser utilizado no dia seguinte) e incubar por 30 minutos a 37°C em banho seco;
5. Durante a incubação do tubo 1, adicionar 180 µL do *buffer* ATL ao tubo nº 2;
6. Após a incubação do tubo nº 1, adicionar 20 µL de proteinase K aos tubos nº 1 e 2 e 25 µL ao tubo nº 3, seguido por 200 µL de *buffer* AL. Vortexar por 15 segundos e incubar a 56°C em banho seco por 10 minutos os tubos nº 2 e 3 e por 30 minutos o tubo nº1;
7. Após a incubação, adicionar 200 µL de etanol (96-100%) aos três tubos e vortexar por 15 segundos. Centrifugar brevemente para remover o líquido da tampa;
8. Adicionar 750 µL de amostra na coluna *DNeasy*, centrifugar a 6000 g por 1 minuto (será utilizado apenas uma coluna para passar o conteúdo dos 3 tubos) e descartar o conteúdo do tubo coletor;

****Repetir o processo acima até que toda a amostra dos três tubos tenha passado pela coluna**!**

9. Descartar o último conteúdo do tubo adquirido no coletor, adicionar 500 µL do *buffer* AW1 à coluna e centrifugar a 6000 g por 1 minuto;

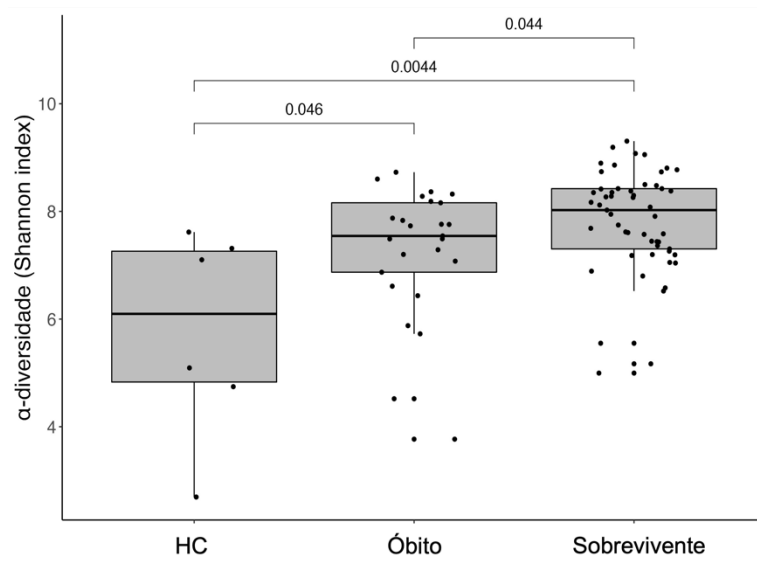
10. Descartar o conteúdo do tubo coletor, adicionar 500 μ L do *buffer* AW2 à coluna e centrifugar em rotação máxima por 3 minutos;
11. Transferir a coluna para um tubo coletor limpo e centrifugar a velocidade máxima por 1 minuto;
12. Transferir a coluna para um microtubo de 1,5 mL limpo e identificado. Adicionar 100 μ L de *buffer* AE à coluna, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugar a 6000 g por 1 minuto para eluição do DNA;

** Caso deseje, adicionar água ultrapura no lugar do *buffer* AE, entretanto, foi observado que a recuperação do material genético fica reduzida neste cenário**.

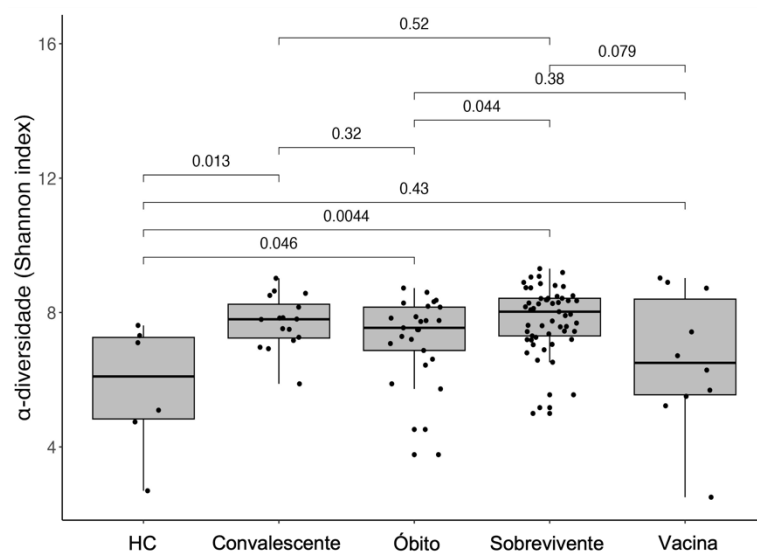
13. Adicionar 50 μ L adicionais de *buffer* AE, incubar por 1 minuto a temperatura ambiente e centrifugar a 6000 g por 1 minuto para aumentar a concentração do DNA eluído;
14. Armazenar a -20°C para posterior uso.

APÊNDICE E – ANÁLISE COMPARATIVA DA α -DIVERSIDADE DE SHANNON PARA OS DEMAIS GRUPOS ANALISADOS NO ESTUDO

A



B



NOTA: Comparação entre os grupos sobreviventes, óbitos e controles não infectados e sem vacinação recente (A) e entre todos os grupos (sobreviventes, óbitos, convalescentes, vacinados e controles não infectados e sem vacinação recente) (B)