

LUCIANA VILAS BOAS CASADIO

Fatores prognósticos para evolução grave na infecção pelo vírus da febre amarela e recorrência de lesão hepática durante a epidemia brasileira de 2018-2019

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho

São Paulo

2022

LUCIANA VILAS BOAS CASADIO

Fatores prognósticos para evolução grave na infecção pelo vírus da febre amarela e recorrência de lesão hepática durante a epidemia brasileira de 2018-2019

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia

Orientador: Prof. Dr. João Renato Rebello Pinho

São Paulo

2022

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

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

©reprodução autorizada pelo autor

Casadio, Luciana Vilas Boas

Fatores prognósticos para evolução grave na infecção pelo vírus da febre amarela e recorrência de lesão hepática durante a epidemia brasileira de 2018-2019 / Luciana Vilas Boas Casadio. -- São Paulo, 2022.

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

Programa de Ciências em Gastroenterologia.
Orientador: João Renato Rebello Pinho.

Descritores: 1. Biópsia 2. Fatores de risco 3. Febre amarela 4. Febres hemorrágicas virais 5. Hepatite 6. Recidiva

USP/FM/DBD-389/22

Responsável: Erinalva da Conceição Batista, CRB-8 6755

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho para todos as pessoas que foram acometidas ou sofreram perdas causadas por patologias infecciosas que poderiam ser evitadas por vacinas ou melhor acesso aos serviços de saúde. De maneira específica, dedico às pessoas que adoeceram pela febre amarela e aos familiares que consentiram a participação neste estudo.

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos que vieram antes de mim e me ajudaram a abrir caminhos para chegar até aqui:

A todos os professores que já passaram pela minha história educacional, especialmente minha mãe Olinda, minha irmã Beatriz e minha avó Aracy, por acreditarem na educação como poder transformador. Ao meu irmão Fábio, meu pai Gerson e todos os Vilas Boas, que sempre valorizaram e incentivaram o acesso ao conhecimento e à saúde como direito básico e universal.

Ao professor, orientador e chefe João Renato, pela confiança, paciência e ensinamentos ao longo desses anos, minha gratidão e admiração. Sua generosidade se reflete em todos os alunos que ajudou a formar e no conhecimento científico que nos auxiliou a produzir.

À minha coorientadora, Dra. Ana Catharina pela confiança depositada em mim mesmo quando eu mesma não acreditei que seria possível. Você foi fundamental para que este trabalho fosse executado e sempre terei enorme gratidão por todas as oportunidades que estiveram no meu caminho. Agradeço o exemplo de profissional que é, sempre a favor da justiça, dos princípios e valores corretos.

Às pesquisadoras do Laboratório de Investigação Médica LIM-07, Dra. Fernanda, Dra. Michele e Prof. Ana Paula. Obrigada pelos ensinamentos, explicações e colaborações ao longo destes anos. A amizade e prestígio que tenho por vocês foi essencial para que este trabalho.

Ao Departamento de Gastroenterologia que me acolheu na pós-graduação e me deu ferramentas para concluir esta tese, à Sra. Vilma que sempre esteve à disposição para esclarecer minhas dúvidas.

À Divisão e Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias, na pessoa da Prof. Anna Sara Levin pelo incentivo de sempre, confiança, orientação e oportunidades de crescimento intelectual e pessoal. Ao Dr. Marcello Magri pela revisão e conselhos, seu altruísmo e generosidade foram de suma importância para a finalização deste trabalho.

Ao Departamento de Patologia, especialmente Prof. Venancio Alves, Prof. Raymundo Azevedo e Dr. Amaro Duarte-Neto pela colaboração e ensinamentos.

Às instituições Hospital das Clínicas, Instituto de Medicina Tropical, Faculdade de Medicina e à Universidade de São Paulo pela excelência e exemplos que mostram ser possível o ensino público, gratuito e de qualidade para seus alunos. Aos funcionários dessas instituições, especialmente Sra. Célia e Sra. Ester.

Aos meus amigos da infectologia e de todas as horas, sempre compartilhando sorrisos, abraços, lágrimas e conhecimentos: Zambon, Matias, Jurila, Ho, Hermes, Adriana, Larissa, Laína, Laís, Glória, Matheus, Oscar, Úrsula, Gabriel, Júlia, Mariane. Entre epidemias, pandemias e endemias vocês foram indispensáveis nesses anos e não eu poderia ter melhores companheiros de trincheiras.

Aos meus amigos Hayashi, Carlos, Bichaff, Verena, Isaac, Samira e tantos da Medicina Rio Preto, agradeço pelos ótimos momentos juntos e por serem pessoas tão generosas. À família Campos-Casadio, obrigada pela compreensão e apoio de sempre.

Ao meu esposo Davi, que sempre me incentiva, apoia e se orgulha de minhas conquistas. Não poderia ter melhor companheiro para todas as horas, seu amor faz os dias mais leves e felizes. Obrigada pela paciência e resiliência.

A todos os profissionais de saúde e pacientes que contribuíram para este trabalho, meus sinceros agradecimentos.

NORMATIZAÇÃO ADOTADA

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

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

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

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

EPÍGRAFE

*“Everybody's got the fever
That is somethin' you all know
Fever isn't such a new thing
Fever started a long ago”*

Fever.
Eddie Cooley e John Davenport.
Fever, 1956.

*“Não livra ninguém
Todo mundo tem remela
Quando acorda às seis da matina
Teve escarlatina
Ou tem febre amarela
Só a bailarina que não tem”*

A ciranda da bailarina.
Edu Lobo e Chico Buarque.
O grande circo místico, 1983.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	2
1.1 Aspectos históricos da febre amarela.....	2
1.2 O vírus da febre amarela.....	3
1.3 Ciclos de transmissão da febre amarela	4
1.4 História natural, tratamento e prevenção da febre amarela.....	5
1.5 Fatores de risco para gravidade em febre amarela	8
1.6 Diagnóstico da febre amarela	8
1.7 Epidemiologia da febre amarela	10
1.8 Febre amarela no estado de São Paulo, 2018-2019	16
2. OBJETIVOS	20
2.1 Objetivos gerais.....	20
2.2 Objetivos específicos.....	20
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
3.1 Centro recrutador de pacientes com FA.....	22
3.2 Seleção de pacientes	24
3.2.1 Definição de caso	24
3.2.2 Critérios de inclusão	25
3.2.3 Critérios de exclusão	25
3.3 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela.....	26
3.4 Hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA).....	27
3.5 Assistência à saúde durante a internação.....	28
3.6 Métodos laboratoriais	28
3.6.1 Detecção e quantificação do RNA do vírus da febre amarela	28
3.6.2 Sequenciamento e genotipagem do vírus da febre amarela	29
3.6.3 Estudo anatomopatológico	30
3.6.4 Detecção molecular do VFA nos fragmentos provenientes de biópsias hepáticas	31
3.7 Análise estatística.....	31

3.7.1 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela.....	31
3.7.2 Hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA).....	33
4. RESULTADOS.....	35
4.1 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela.....	37
4.1.1 Análise univariada.....	39
4.1.2 Regressão logística	40
4.1.3 Análise filogenética do gene do envelope do VFA e genotipagem.....	45
4.2 Hepatite tardia associada à febre amarela	47
4.2.1 Descrição clínico-laboratorial	47
4.2.2 Descrição anatomopatológica	51
5. DISCUSSÃO.....	54
5.1 Apresentação clínica distinta e mortalidade em casos internados.....	56
5.3 Envolvimento pancreático e dosagem de lipase	58
5.4 Insuficiência hepática aguda, coagulopatia e fator V	60
5.5 Dano hepático e a relação AST/ALT	63
5.6 Carga viral do VFA	64
5.7 Reservatórios virais possíveis, detecção prolongada em sangue e urina	65
5.8 Hepatite tardia associada à FA (HT-FA).....	67
6. CONCLUSÕES	72
6.1 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela.....	72
6.2 Hepatite tardia associada à febre amarela.....	73
7. REFERÊNCIAS.....	75
8. ANEXOS.....	96
ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)	96
ANEXO B – Parecer Consubstanciado do CEP	100
ANEXO C - Biópsias hepáticas de hepatite tardia associada a febre amarela	104

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ALT	alanina aminotransferase
Anti-HBs	anticorpo contra o antígeno de superfície da Hepatite B
AST	aspartato aminotransferase
C	proteína do capsídeo
CAPPesq	Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa
CKD-EPI	Colaboração em epidemiologia da doença renal crônica (do inglês, <i>Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration</i>)
CROSS	Central de Regulação de Ofertas de Serviços de Saúde
DNA	Ácido desoxirribonucleico (do inglês, <i>Deoxyribonucleic acid</i>)
DP	desvio padrão
E	proteína do envelope
ELISA	ensaio sorológico para identificação de anticorpos (do inglês, <i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>)
FA	febre amarela
FFPE	Fixação em formalina e embebido em parafina (do inglês, <i>fixed in formalin and embedded in paraffin</i>)
GC	guanina-citosina
HCFMUSP	Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo
HT-FA	Hepatite tardia associada à febre amarela
IAL	Instituto Adolfo Lutz
IC	intervalo de confiança
IgG	imunoglobulina G
IgM	imunoglobulina M
IHQ	imunohistoquímica

- INR** razão normalizada internacional (do inglês, *international normalized ratio*)
- K-M** Kaplan-Meyer
- LIM** Laboratório de Investigação Médica
- n** número de pessoas
- NS** proteína não estrutural (do inglês, *non-structural protein*)
- OMS** Organização Mundial de Saúde
- OR** razão de probabilidades (do inglês, *odds ratio*)
- pb** pares de bases
- PCR** reação em cadeia da polimerase (do inglês, *polymerase chain reaction*)
- PNH** primata não humano
- prM/M** proteína pré membrana/membrana
- qPCR** PCR em tempo real
- RNA** ácido ribonucleico (do inglês, *ribonucleic acid*)
- RNC** regiões não codificantes
- ROC** Do inglês, *Receiver Operating Characteristic*
- RT** transcrição reversa (do inglês, *reverse transcriptase*)
- RT-qPCR** PCR em tempo real
- SES-SP** Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo
- SUS** Sistema Único de Saúde
- TCLE** termo de consentimento livre e esclarecido
- VFA** vírus da febre amarela

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Organização do genoma dos flavivírus e processamento da poliproteína viral de aproximadamente 11.000 pares de bases. O genoma viral é representado com as regiões codificantes de proteínas estruturais e não-estruturais, junto das regiões não codificantes (RNC) 5' e 3'. Os retângulos coloridos indicam as proteínas virais geradas 3
- Figura 2 Ciclos epidemiológicos da febre amarela. No ciclo urbano, o vetor consiste no *mosquito Aedes aegypti*. Já no ciclo silvestre, os vetores são os mosquitos *Haemagogus sp.* ou *Sabethes sp.*..... 5
- Figura 3 - História natural clássica da febre amarela. A partir da picada do mosquito infectado, tem-se início o período de incubação, seguido dos períodos de infecção, remissão, intoxicação e recuperação ou morte. Abaixo, as curvas correspondentes ao período de viremia e anticorpos detectável... 6
- Figura 4 – Países com risco de transmissão de febre amarela. 12
- Figura 5 - Distribuição dos casos humanos de febre amarela registrados no Brasil, segundo a região do local provável de infecção (LPI), amazônica ou extra-amazônica, entre os períodos de monitoramento 1998/1999 e 2019/2020. Nos dados destacados em vermelho, detecção de casos fora da região amazônica..... 14
- Figura 6 - Reemergência da febre amarela no Brasil. Casos humanos ou epizootias, período de 2014 a 2020. ASRV: áreas sem recomendação vacinal; ACRV: áreas com recomendação vacinal. 15
- Figura 7 - Fluxo para atendimento e regulação de casos suspeitos de febre amarela para serviços de referência no estado de São Paulo, abril de 2018. 23
- Figura 8 - Fluxograma de seleção de pacientes internados com febre amarela no HCFMUSP nos anos de 2018 e 2019. Quadros verdes representam

pacientes sobreviventes e quadros em vermelho os casos que foram a óbito. Os sobreviventes dos dois anos acompanhados ambulatorialmente são representados nos quadros azuis. As áreas em cinza delimitadas pelas linhas tracejadas mostram os agrupamentos de casos correspondentes aos dois artigos publicados desta tese 36

Figura 9 - Painel à esquerda: curvas de sobrevida de Kaplan-Meier comparando os grupos divididos de acordo com o fator V abaixo e acima de 56,5%. Painel à direita: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier comparando grupos divididos de acordo com lipase abaixo e acima de 147,5 U/L 44

Figura 10 Genotipagem do vírus da febre amarela baseada em análise filogenética usando o método de máxima verossimilhança usando o tempo geral reversível como modelo de substituição e 500 replicações *bootstrap*. 46

Figura 11 - A. Padrão típico de “hepatite lobular” com apoptose e necrose focal de hepatócitos. As células de Kupffer são hipertróficas; B. Necrose confluyente permeada por leucócitos diversos, mono e polimorfonucleares. As células de Kupffer hipertróficas são visualizadas em sinusóides dilatados; C. Edema portal moderado e infiltrado inflamatório misto apresentam focos de transbordamento; D. Esteatose macrovesicular, não reminiscente de febre amarela aguda, foi encontrada em apenas um caso, com inflamação lobular e portal mínima; E. Detecção imuno-histoquímica do antígeno da febre amarela (FA-Ag) quase restrita ao citoplasma das células de Kupffer hipertróficas nesta área de inflamação lobular mínima. F. FA-Ag imuno-corado 52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Definições de caso de febre amarela para vigilância em saúde pública segundo a Organização Mundial de Saúde, 2010 (60, 61)	9
Tabela 2 - Dados demográficos e laboratoriais de 62 pacientes com febre amarela grave, classificados de acordo com o desfecho sobreviventes ou óbito. Análise univariada.....	38
Tabela 3 Resultados completos da regressão logística binomial, métodos <i>backward stepwise</i> , mostrando os testes estatísticos que avaliam a significância dos coeficientes das variáveis e a qualidade do modelo para cada etapa do processo.....	41
Tabela 4 Características dos 58 pacientes com febre amarela, de acordo com o status em relação à hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA) ..	48
Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes com hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA)	49

RESUMO

Casadio LVB. *Fatores prognósticos para evolução grave na infecção pelo vírus da febre amarela e recorrência de lesão hepática durante a epidemia brasileira de 2018-2019* [tese]. São Paulo: Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo; 2022.

Introdução: A febre amarela (FA) é uma doença endêmica de regiões tropicais e subtropicais do continente sul-americano e africano. É causada pelo vírus da febre amarela, flavivírus transmitido através da picada de mosquitos. A infecção é prevenível por vacina com alta eficácia disponível desde o início do século XX, mas ainda é causa de surtos em regiões com cobertura vacinal inadequada. Este estudo avaliou os fatores de risco para óbito em pacientes com FA grave internados em leitos de terapia intensiva e a evolução dos casos sobreviventes em um período de 6 meses após a infecção inicial. **Métodos:** Sessenta e dois casos de FA grave internados em unidade de terapia intensiva no ano de 2018 foram avaliados quanto a variáveis clínicas e laboratoriais e sua relação com o óbito ou sobrevivência. Os casos sobreviventes de FA em 2018 e 2019 foram acompanhados clínica e laboratorialmente após a alta hospitalar. **Resultados:** Os casos de FA grave internados em unidade de terapia intensiva no ano de 2018 exibiram apresentação clínica diferente de descrições clássicas da doença pois a icterícia não foi percebida inicialmente, bem como o RNA viral pode ser detectado por semanas em sangue e urina. Já na análise de alterações laboratoriais, a regressão logística mostrou que a dosagem de fator V abaixo de 56,5% e da lipase acima de 147,5 U/L associaram-se diretamente ao óbito, enquanto a média de carga viral quando relacionada com o desfecho não foi estatisticamente significativa. Entre os casos que não faleceram e puderam ser acompanhados após a alta, em 26 deles foi caracterizada uma nova inflamação no parênquima hepática, confirmada pelo incremento nas aminotransferases e estudo histopatológico compatível com inflamação tecidual e a presença antígenos virais imunomarcados no interior de macrófagos hepáticos, mesmo que fora do período de fase aguda da doença. **Conclusões:** A FA apresentou-se de maneira diferente do exposto previamente, tanto na sua forma clínica quanto na detecção viral prolongada em sangue e urina. Ainda é uma doença de potencial letalidade nos casos graves que necessitam de suporte intensivo. A dosagem da lipase e fator V discrimina os casos com maior probabilidade de óbito onde medidas terapêuticas podem ser instituídas precocemente. Encontramos um novo aumento de aminotransferases após a recuperação inicial de FA, denominada hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA) com alterações histopatológicas inflamatórias e presença de antígenos virais com aparente evolução benigna e sem fibrose hepática posterior até o momento. Os pacientes que sobrevivem à FA inicial necessitam de monitoramento de aminotransferases e bilirrubinas posteriormente à fase aguda inicial.

Descritores: Biópsia; Fatores de risco; Febre amarela; Febres hemorrágicas virais; Hepatite; Recidiva.

ABSTRACT

Casadio LVB. *Prognostic factors for the severe evolution in yellow fever virus infection and recurrence of a new liver injury named late-onset relapsing hepatitis associated with yellow fever during the 2018-2019 Brazilian epidemic* [thesis]. São Paulo: "Faculdade de Medicina, Universidade de São Paulo"; 2022.

Introduction: Yellow fever (YF) is an endemic disease in tropical and subtropical regions of South America and Africa. It is caused by the yellow fever virus, a flavivirus transmitted through the bite of mosquitoes. The infection has been preventable by a highly effective vaccine available since the beginning of the 20th century, but it is still the cause of outbreaks in regions with inadequate vaccine coverage. This study evaluated risk factors for death in patients with severe YF admitted to intensive care beds and the outpatient evolution of surviving cases after the initial infection. **Methods:** Sixty-two cases of severe YF were admitted to the intensive care unit in 2018. The cases were evaluated for clinical and laboratory variables and their relationship with outcomes of death or survival. YF surviving cases in 2018 and 2019 were clinically and laboratory followed up after hospital discharge. **Results:** Cases of severe YF admitted to the intensive care unit in 2018 exhibited a clinical presentation distinct from classic descriptions of the disease. The jaundice was not initially witnessed, and viral RNA could be detected in blood and urine samples for several weeks. The logistic regression made with laboratory tests findings at the YF acute phase indicates that the dosage of factor V below 56.5% and lipase above 147.5 U/L were directly associated with death. However, the mean viral load did not show statistical significance related to the lethal outcome. Among the surviving cases that could be followed up after hospital discharge, 26 showed a new inflammation in the liver parenchyma, confirmed by the increase in aminotransferases and liver biopsy analysis. The histopathological study on liver samples exhibits tissue inflammation. The presence of immunolabeled viral antigens inside hepatic macrophages was registered, even after the acute phase of the disease. **Conclusions:** YF presented unusually from previously described, both in clinical form and in the prolonged viral RNA detection in blood and urine samples. Furthermore, YF is still a potentially lethal disease in severe cases that require intensive care. For these cases, lipase and factor V measures could discriminate the cases with a greater probability of death, and therapeutic measures should be defined early. After the initial acute phase, survival subjects require monitoring of aminotransferases and bilirubin. We found a new rebound in aminotransferases after the recovery from the initial YF, named late-onset relapsing hepatitis associated with yellow fever, with inflammatory histopathological changes and the presence of viral antigens. However, this second injury has an apparent benign evolution and no subsequent hepatic fibrosis detected to date.

Descriptors: Biopsy; Risk factors; Yellow fever; Hemorrhagic fevers viral; Hepatitis; Recurrence.

1.INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A febre amarela (FA) representa a descrição original das febres hemorrágicas virais e tem como agente etiológico o vírus da febre amarela (VFA), transmitido pela picada de mosquitos infectados ⁽¹⁾. Consiste em doença febril aguda, com ampla variação de apresentação clínica ⁽²⁾. Apesar de existir uma vacina com alta eficácia desenvolvida no início do século XX, ainda é responsável por epidemias nos dias atuais, configurando um considerável agravo de saúde pública, principalmente em países em desenvolvimento ^(3, 4).

1.1 Aspectos históricos da febre amarela

Análises filogenéticas remontam a origem do vírus da febre amarela (VFA) há aproximadamente 1.500 anos no continente africano e trazido também para as Américas através da diáspora africana a partir do século XVI ⁽⁵⁾. Embora não seja natural do continente americano, o VFA encontrou condições ideais de reservatórios em primatas não humanos, vetores para transmissão e condições ecológicas para sua disseminação e perpetuação, sendo responsáveis por vários surtos com alta morbimortalidade ⁽⁶⁾.

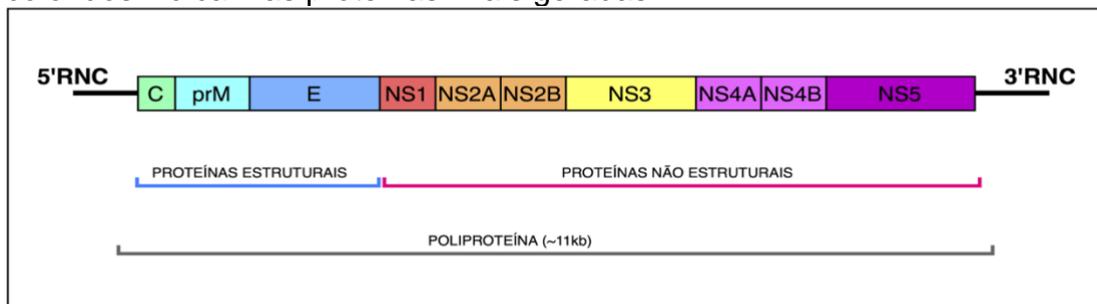
O primeiro surto registrado de FA no continente americano data de 1648 na península de Yucatán, México ⁽⁷⁾, onde há relatos de doença febril com vômitos enegrecidos sucedidos por icterícia expressiva em sobreviventes. Pela perda numérica expressiva de contingente militar e força de trabalho braçal, entidades governamentais financiaram linhas de pesquisa para entendimento da FA, descoberta da transmissão por vetores artrópodes, do agente etiológico e o futuro desenvolvimento de uma vacina ⁽⁸⁾.

1.2 O vírus da febre amarela

O VFA é o primeiro vírus humano a ser descrito ^(9, 10) pertence à família *Flaviviridae*, gênero *Flavivirus*, da qual também fazem parte outros vírus de transmissão e apresentação clínica semelhantes, como Zika, West Nile e dengue. O gênero *Flavivirus* possui mais de cinquenta espécies virais diferentes, que compartilham características comuns como forma, estrutura genética e proteica. Alguns membros desta família são denominados “arbovírus”, acrônimo para “*Arthropod-BOrne virus*”, pela forma de transmissão através da picada de insetos ^(11, 12).

O VFA é um vírus com genoma de RNA fita simples de polaridade positiva, envelopado, com material genético constituído de 10.233 nucleotídeos que codificam uma única poliproteína. Por meio de proteases virais e celulares, a poliproteína é clivada em 7 proteínas não-estruturais (NS1, NS2A, NS2B, NS3, NS4A, NS4B e NS5) e 3 proteínas estruturais: capsídeo (C), precursor da proteína da membrana (prM) e envelope (E) (Figura 1) ^(13, 14).

Figura 1 - Organização do genoma dos flavivírus e processamento da poliproteína viral de aproximadamente 11.000 pares de bases. O genoma viral é representado com as regiões codificantes de proteínas estruturais e não-estruturais, junto das regiões não codificantes (RNC) 5' e 3'. Os retângulos coloridos indicam as proteínas virais geradas



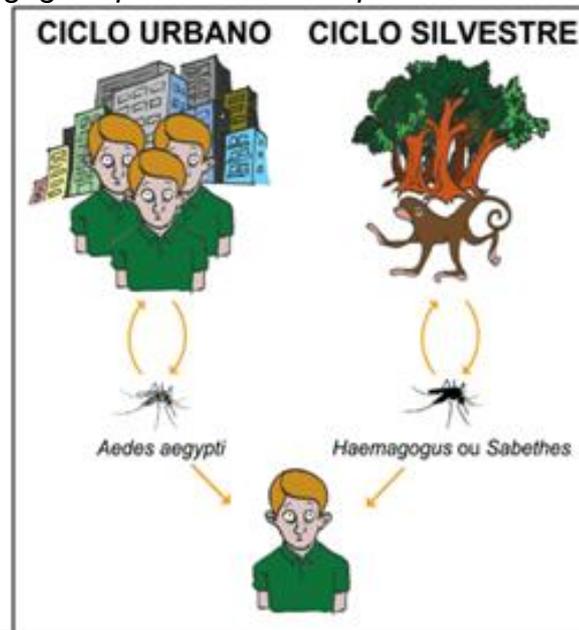
FONTE: Adaptação de imagem disponibilizada pelo *International Committee on Taxonomy of Viruses* (ICTV) ⁽¹⁵⁾.

O VFA é classificado em um único sorotipo e dividido em sete genótipos: Oeste I, Oeste II, Leste / Central e Leste da África, Angola e América do Sul I e II sendo o genótipo I predominante no Brasil, dividido em 5 linhagens distintas ^(12, 16). A linhagem I E é a responsável pelos surtos mais recentes no Brasil e tem sua origem na região noroeste do país, em áreas de transição dos biomas de matas tropicais com cerrado e progressão gradativa para o sudeste brasileiro ^(17, 18).

1.3 Ciclos de transmissão da febre amarela

A infecção pelo VFA se dá através de picadas de fêmeas de mosquitos dos gêneros *Haemagogus* e *Sabethes* na América do Sul e *Aedes* na África. O ciclo silvestre ocorre através da contaminação de primatas não humanos (PNH) pelas picadas dos mosquitos infectados com o vírus. Entretanto, em ocasiões em que seres humanos possam transitar por ambientes silvestres, há a possibilidade de transmissão da doença para estes pela mesma via. A FA urbana acontece quando a transmissão se dá somente através de humanos e mosquitos em áreas de cidades, onde os mosquitos do gênero *Aedes* costumam ser os vetores principais. Há também participação do *Aedes* em regiões de savanas africanas, onde pode ocorrer um ciclo intermediário entre o urbano e o silvestre (Figura 2) ^(14, 19, 20).

Figura 2 Ciclos epidemiológicos da febre amarela. No ciclo urbano, o vetor consiste no *mosquito Aedes aegypti*. Já no ciclo silvestre, os vetores são os mosquitos *Haemagogus sp.* ou *Sabethes sp.*

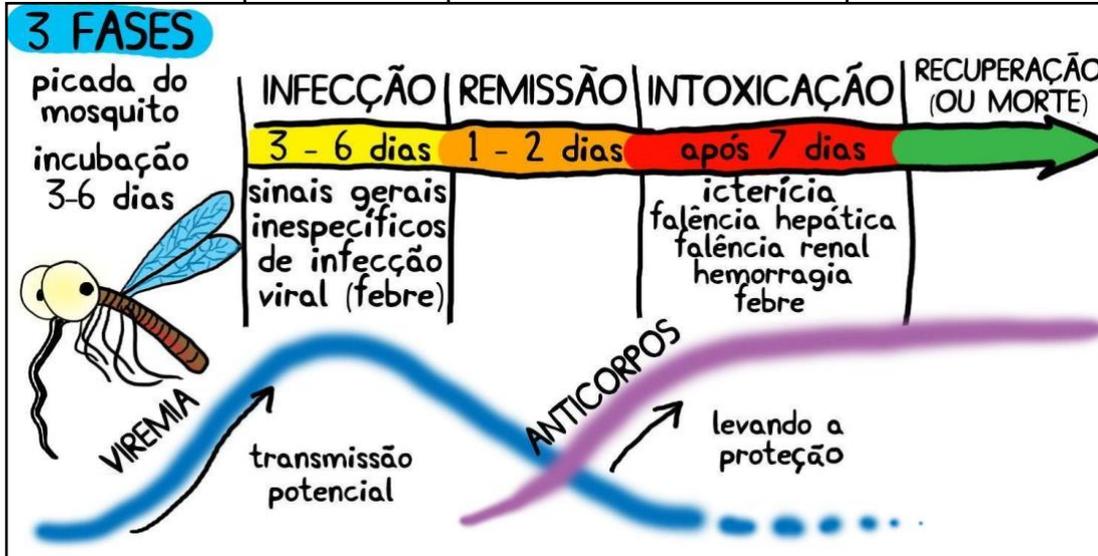


FONTE: Imagem cortesia cedida pelo Dr. Marcio Nastri, adaptado de ⁽²¹⁾

1.4 História natural, tratamento e prevenção da febre amarela

Assim como a maioria das doenças virais agudas, a FA pode apresentar-se de forma espectral, com indivíduos pouco sintomáticos ou assintomáticos até quadros catastróficos refratários às intervenções terapêuticas ⁽³⁾. A proporção de indivíduos assintomáticos e com as diversas manifestações clínicas ainda não está bem definida, mas estima-se que aproximadamente metade dos infectados apresentam infecção assintomática, enquanto cerca de 12% representam os casos graves ⁽²²⁾.

Figura 3 - História natural clássica da febre amarela. A partir da picada do mosquito infectado, tem-se início o período de incubação, seguido dos períodos de infecção, remissão, intoxicação e recuperação ou morte. Abaixo, as curvas correspondentes ao período de viremia e anticorpos detectável



FONTE: Cortesia do Dr. Marcio Nastri, adaptado de ⁽²³⁾.

Após a inoculação viral pela picada do mosquito, há um período de incubação de 3 a 5 dias até o início abrupto de sintomas inespecíficos como febre, mialgia, dor de costas, hiporexia, náuseas e mal-estar. Este é denominado período de infecção, de duração de 5 dias em média, com detecção do vírus em corrente sanguínea (Figura 4) ^(12, 24-26). O sinal de Faget pode estar presente ou não ⁽²⁷⁾. Classicamente, a FA cursa com melhora parcial dos sintomas e até defervescência, após alguns dias do início dos sintomas, no chamado período de remissão, com duração de 2 a 24 horas ⁽³⁾. Entretanto, em 15 a 25% dos casos, os sintomas podem voltar com maior intensidade no chamado período de intoxicação, com vômitos, dores abdominais, manifestações hemorrágicas, insuficiência renal e insuficiência hepática fulminante, com evolução para choque e óbito em 20 a 50% dos casos ⁽²⁸⁾. Embora não enfatizada em descrições anteriores, a pancreatite parece ser um componente importante para a piora sistêmica progressiva e evolução a óbito nos casos graves ⁽²⁹⁻³²⁾.

Os casos que evoluem para óbito apresentam histopatologia típica de acometimento hepático viral agudo pelo VFA e vasculopatia de causa infecciosa. Dentre as principais alterações *post mortem*, destaca-se a necrose hemorrágica maciça médio-zonal, principalmente em zona 2 dos lóbulos hepáticos com preservação da trama de reticulina. Há apoptose de hepatócitos, provavelmente deflagrada por efeito direto viral e da resposta imune a antígenos locais, visualizada na degeneração acidófila denominada corpúsculos de Councilman-Rocha Lima, associada à esteatose macro e microvesicular ^(2, 33). Embora o acometimento do tecido hepático seja extenso, notoriamente há discreto infiltrado linfomononuclear local, com predominância neutrofílica próximas às áreas de maior necrose ⁽³⁴⁾. O antígeno viral pode ser visualizado em reações por imuno-histoquímica nos macrófagos e hepatócitos ^(29, 35, 36).

Os sobreviventes seguem para fase de convalescença com astenia prolongada e recuperação gradual da funcionalidade ⁽³⁷⁾. Após a recuperação, aparentemente não há sequelas cicatriciais decorrentes das lesões hepáticas e renais ⁽²⁾.

A FA ainda é considerada uma doença tropical negligenciada e atinge países em desenvolvimento com poucos recursos médicos e laboratoriais ⁽³⁸⁾. Muito do que se sabe hoje foi extrapolado de outras febres hemorrágicas ou de estudos *in vitro* ^(14, 39). Entretanto, o entendimento da fisiopatogenia tem sido aprimorado por estudos recentemente publicados com conhecimentos e recursos da terapia intensiva moderna, estudo patológico direcionado e avanços da biologia molecular ^(30, 31, 37, 40–45).

Até o presente momento, não há tratamento específico para a doença além de suporte clínico intensivo e manejo de sintomas ⁽⁴⁶⁾. Porém, novas estratégias terapêuticas encontram-se em avaliação: transplante hepático ^(47–50), troca plasmática ⁽³⁰⁾ e o reposicionamento de medicamentos antivirais já utilizados para tratamento de outros flavivírus, como o sofosbuvir ^(51, 52).

A FA é prevenível por vacina de vírus vivos atenuados, cultivados em ovos embrionados de galinha ⁽⁵³⁾. A vacina de FA apresenta imunogenicidade

de até 98% em dosagem de anticorpos neutralizantes ⁽⁵⁴⁾. A vacina está disponível pelo Sistema Único de Saúde em todo território nacional e preconizada como dose única após os 9 meses de idade. Gestantes e imunodeprimidos em geral necessitam de avaliação individualizada sobre risco-benefício pela possibilidade de doença neurotrópica e viscerotrópica pelo vírus vacinal ⁽⁵⁵⁾.

1.5 Fatores de risco para gravidade em febre amarela

Desde as descrições mais antigas de epidemias de FA são descritas as alterações clínicas e/ou laboratoriais e a relação destas com possíveis desfechos. Nos últimos anos, estudos atuais também avaliaram tais alterações e outras mais de acordo com a tecnologia disponível e tentam relacionar com os resultados de pior evolução. Embora as casuísticas possam diferir entre si na estratificação de gravidade dos casos, há relativo consenso de que idade, grau de lesão hepática (avaliada pelas medidas de aminotransferases e coagulopatias) e disfunções renais são marcadores de evolução para óbito na FA grave ^(30, 31, 40, 56–59).

1.6 Diagnóstico da febre amarela

Segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), o diagnóstico da infecção pela FA é feito pelos seguintes critérios ^(60, 61):

Tabela 1 - Definições de caso de febre amarela para vigilância em saúde pública segundo a Organização Mundial de Saúde, 2010 (60, 61)

Tipo de caso	Definição
Caso suspeito	Qualquer indivíduo com início agudo de febre e icterícia até 14 dias do início dos sintomas.
Caso provável	<p>Definição de “caso suspeito” E um dos itens listados abaixo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Presença de anticorpos IgM específicos para FA na ausência de vacina de febre amarela nos últimos 30 dias antes do início dos sintomas; ● Histopatologia positiva após o óbito; ● Vínculo epidemiológico com caso confirmado ou surto
Caso confirmado	<p>Definição de “caso provável” E um dos itens listados abaixo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Presença de anticorpos IgM específicos para FA; ● Aumento de 4 títulos sorológicos na dosagem de anticorpos IgM ou IgG específicos para FA ou ambos, entre a fase aguda e convalescença da doença; ● Detecção de anticorpos neutralizantes específicos para FA. <p style="text-align: center;">ASSOCIADO A</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ausência de vacinação para FA nos últimos 30 dias antes do início dos sintomas
OU	
	<p>Definição de “caso provável” E um dos itens listados abaixo:</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Detecção do genoma viral de FA em sangue ou outros órgãos por RT-qPCR; ● Detecção do antígeno de FA em sangue, fígado ou outros órgãos por ensaio imunológico; ● Isolamento do vírus da FA <p style="text-align: center;">ASSOCIADO A</p> <ul style="list-style-type: none"> ● Ausência de vacinação para FA nos últimos 14 dias antes do início dos sintomas

Em relatório publicado pela própria OMS em 2018, há um adendo aos critérios diagnósticos onde a viremia detectável pelo RT-qPCR é mais

sensível nos primeiros 10 dias, mas em casos mais graves e/ou fatais, esta pode ser detectável além dos 14 dias iniciais ⁽⁶²⁾.

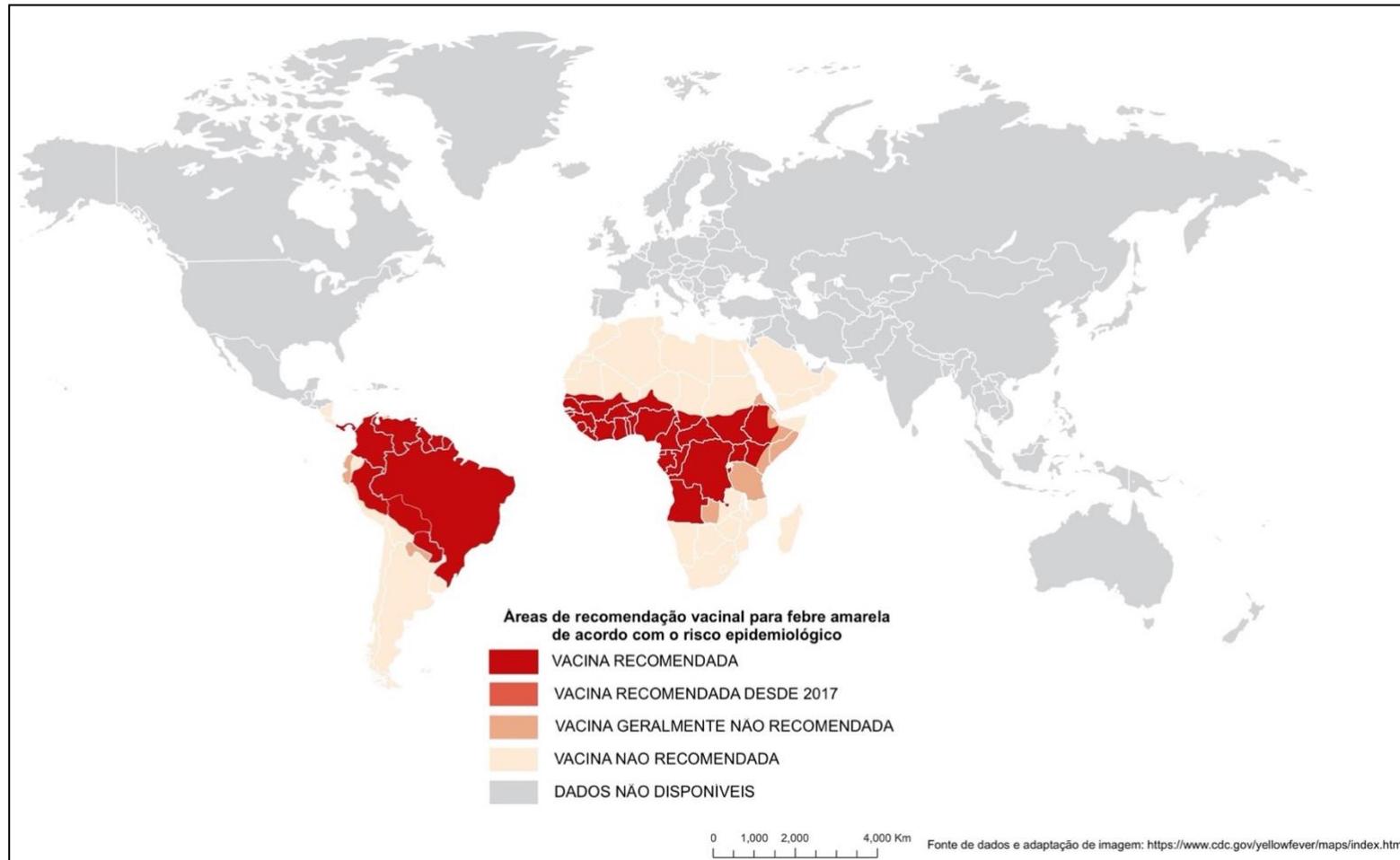
O Ministério da Saúde brasileiro utiliza uma definição semelhante à da OMS e descreve como suspeita clínica de FA “indivíduo com exposição em área afetada recentemente (em surto) ou em ambientes rurais e/ou silvestres destes, com até sete dias de quadro febril agudo (febre aferida ou relatada) acompanhado de dois ou mais dos seguintes sinais e sintomas: cefaleia (principalmente de localização supra orbital), mialgia, lombalgia, mal-estar, calafrios, náuseas, icterícia e/ou manifestações hemorrágicas, sendo residente ou procedente de área de risco para FA, nos 15 dias anteriores, que não tenha comprovante de vacinação de febre amarela ou que tenha recebido a primeira dose há menos de 30 dias”. Do ponto de vista laboratorial, recomenda a demonstração de anticorpos específicos para FA em sangue coletado após o quinto dia de sintomas ou detecção de RNA de VFA por RT-qPCR ou isolamento viral em sangue até o 5º dia de sintomas ou RT-qPCR ou isolamento viral ou histopatologia em tecido até 24 horas após o óbito ⁽⁶³⁾. Porém, após os recentes surtos de FA, estudos publicados demonstraram a possibilidade de diagnóstico confirmatório por RT-qPCR em urina como método adicional muitas vezes mais acessível e com positividade por tempo prolongado quando comparado com a detecção de RNA viral em sangue ^(64, 65).

1.7 Epidemiologia da febre amarela

Até o presente momento, a FA acomete somente países da América Latina e África Subsaariana (Figura 4). Por se tratar de uma zoonose, não é possível eliminá-la completamente, mas seu controle pode ser realizado através da vacinação de humanos em áreas de risco para doença. Anualmente, são reportados mais de 200 mil casos de FA em todo mundo, com mais de 30 mil óbitos, embora tais números sejam imprecisos porque são notificados apenas os casos sintomáticos, que cursam com febre e icterícia ^(3, 54, 66). Esta caracterização prejudica a contabilização de casos com poucos

sintomas e alterações clínicas que sejam distinguíveis de outras síndromes infecciosas agudas ^(3, 14).

Figura 4 – Países com risco de transmissão de febre amarela.



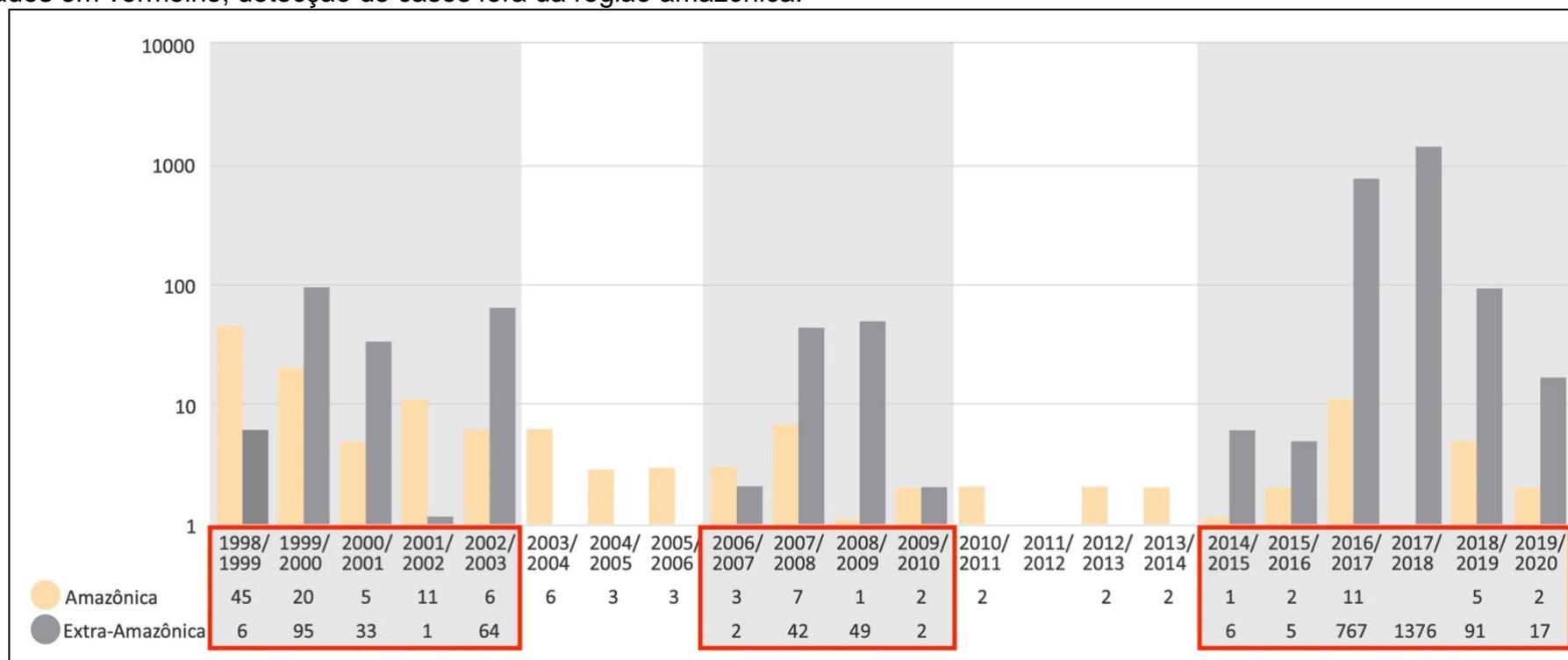
FONTE: adaptação de Center for Diseases Prevention and Control – CDC (21)

No Brasil, a FA é uma doença endêmica e de notificação compulsória imediata ⁽⁶³⁾. A maior incidência dos casos notificados ocorre entre dezembro e maio, concomitantemente com as temperaturas mais quentes do verão e maior prevalência de chuvas, o que favorece a proliferação dos mosquitos vetores ⁽⁶⁷⁾.

Com a comprovação da transmissão da doença via mosquitos contaminados, houve campanhas para erradicação de vetores por todo o continente americano no início do século XX e desde então não há registro de casos de FA em regiões urbanas ⁽⁶⁸⁾. O último caso de FA urbana no Brasil foi registrado na cidade de Sena Madureira - AC em 1942 ⁽⁶⁹⁾. Desde então, casos esporádicos foram detectados somente em pessoas que frequentam áreas silvestres de risco para FA sem imunização prévia adequada ^(70, 71).

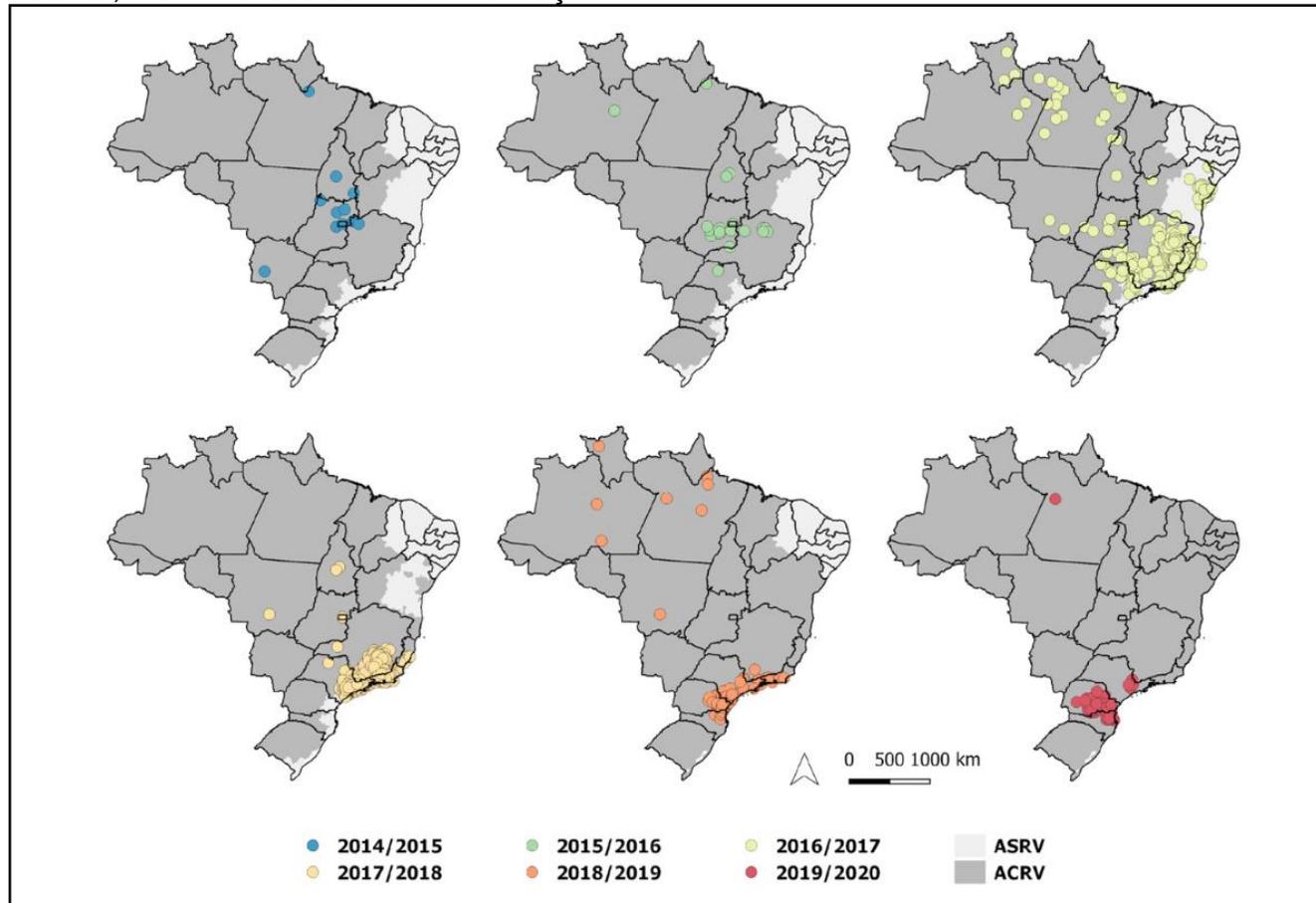
Desde 2007, houve um aumento progressivo na detecção de epizootias de FA em PNH, com a migração destes casos para fora da bacia do Rio Amazonas em direção à região sudeste do país, principalmente em áreas anteriormente livres de circulação viral e, portanto, sem recomendação de vacina (Figuras 5 e 6). Nestas áreas se encontra a região mais populosa e povoada do Brasil, com grandes centros urbanos como as capitais estaduais Belo Horizonte, Vitória, Rio de Janeiro e São Paulo ^(17, 72-74).

Figura 5 - Distribuição dos casos humanos de febre amarela registrados no Brasil, segundo a região do local provável de infecção (LPI), amazônica ou extra-amazônica, entre os períodos de monitoramento 1998/1999 e 2019/2020. Nos dados destacados em vermelho, detecção de casos fora da região amazônica.



FONTE: Ministério da Saúde, Brasil, 2021. ⁽⁷⁵⁾

Figura 6 - Reemergência da febre amarela no Brasil. Casos humanos ou epizootias, período de 2014 a 2020. ASRV: áreas sem recomendação vacinal; ACRV: áreas com recomendação vacinal.



FONTE: Ministério da Saúde, Brasil, 2021. (75)

Entre 2014 e 2015, a transmissão aconteceu na região norte do país, com posterior expansão no sentido leste e sul ⁽⁷⁶⁾. A partir de meados de 2016 foi registrado aumento mais expressivo de casos, afetando principalmente a região sudeste ⁽⁷⁷⁾. Estudos genéticos realizados entre dezembro de 2016 a outubro de 2017 demonstraram que este surto se originou no noroeste do país e migrou gradativamente numa velocidade de 4,25 km/dia ^(17, 77-79) com diferenças de velocidade sazonais ⁽⁸⁰⁾.

Publicações posteriores mostram que a migração do vírus conjuntamente com PNH continuou em curso à região sul do Brasil, com epizootias e novos casos humanos também em 2020 e 2021 ⁽⁸¹⁾. Até o presente momento, não há registro de casos de febre amarela urbana, ou seja, com transmissão por vetores e em cenários sem exposição ao ambiente silvestre ^(17, 41, 42, 74, 78, 82).

1.8 Febre amarela no estado de São Paulo, 2018-2019

A partir do mês de janeiro de 2018, o número de casos e óbitos confirmados por FA aumentou vertiginosamente, causando o maior surto registrado no século XXI. No período entre julho de 2017 a junho de 2018, foram notificados 7.518 casos humanos suspeitos de FA, com 1.376 casos confirmados em todo Brasil. Dentre estes, 483 evoluíram para o óbito, evidenciando uma letalidade de 35,1% ⁽⁸³⁾. A maior parte dos casos ocorre em pacientes do sexo masculino e idade economicamente ativa, uma vez que esses indivíduos se expõem com maior frequência a áreas e situações de risco, sobretudo em decorrência de atividades relacionadas ao trabalho ⁽⁷⁸⁾. Em 2019, foram notificados 1281 casos suspeitos, com 82 confirmados e 14 óbitos (17,1% de letalidade) ⁽⁸⁴⁾.

A ocorrência do surto, de proporções sem precedentes, ainda requer explicações definitivas, mas acredita-se que tenha causalidade multifatorial ^(41, 42, 78). A circulação viral em áreas antes não afetadas e com indivíduos suscetíveis, migração de pessoas pelo território nacional, urbanização de

áreas de transição silvestre, áreas de recomendação vacinal sem cobertura adequada, falhas no sistema de vigilância de epizootias e, possivelmente, fatores ambientais e ecológicos são apontados como contribuintes para a mudança epidemiológica da FA no Brasil (44, 71, 73, 85, 86). De tais fatores, a mudança da densidade florestal influenciou a presença de corredores ecológicos onde primatas não humanos e mosquitos vetores infectados pudessem migrar para áreas antes livres de circulação viral. O papel de mudanças em ecossistemas, o aquecimento global, a dinâmica populacional de primatas não humanos e seus ciclos reprodutivos, a influência dos vetores e as relações humanas-ambientais de cada um destes fatores são objetivo de estudos já publicados (80, 87–89).

Após o aumento expressivo do número de casos, iniciaram-se campanhas de vacinação maciças visando principalmente áreas com detecções recentes de epizootias (90). Pela escassez constante de estoque de vacina de FA em escala global e a presença de indivíduos suscetíveis em áreas de risco para FA, em consonância com as recomendações da OMS e de acordo com o realizado durante a epidemia em Angola e República Democrática do Congo em 2016 e, optou-se pelo início da vacinação com uso de dose fracionada, 0,1 mL, ao invés de 0,5 mL da dose integral tradicional (91). No Brasil a estratégia de vacinação com uso de dose fracionada também foi utilizada (92).

Os casos encaminhados para internação hospitalar foram direcionados a partir do fluxo feito por especialistas e determinado em conjunto com a Secretaria Estadual de Saúde de São Paulo (SES-SP). Tais critérios não existiam antes porque o hospital nunca havia experimentado uma situação semelhante.

Diante da gravidade e letalidade da doença, em associação ao número crescente de internações no HCFMUSP, o Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – LIM 07 do Departamento de Gastroenterologia do HCFMUSP, no contexto do projeto já aprovado “Caracterização das hepatites agudas em centros de referência da cidade de São Paulo”, desde o dia 10 de

janeiro de 2018 estabeleceu um fluxo para o recebimento de amostras dos casos suspeitos de FA internados no HCFMUSP. Assim, o resultado do teste diagnóstico dessa infecção para a equipe médica assistente passou a ser disponibilizado em até 24 horas após o recebimento do material.

Devido à maior disponibilidade de recursos tecnológicos, leitos de terapia intensiva e equipe de transplante hepático, os casos de maior gravidade clínica e laboratorial foram referenciados ao HCFMUSP, especificamente para as unidades de terapia intensiva das divisões de Moléstias Infecciosas e Parasitárias e Gastroenterologia. Após a alta hospitalar, os pacientes sobreviventes foram acompanhados no ambulatório de Moléstias Infecciosas do HCFMUSP.

A FA é uma doença de alta letalidade e pouco estudada à luz dos conhecimentos atuais de biologia molecular, manejo de cuidados intensivos e posterior acompanhamento ambulatorial dos sobreviventes. Após a alta hospitalar dos casos sobreviventes, foi notado em alguns pacientes um novo aumento de aminotransferases e parte deles exibiu sintomas clínicos associados. Até o momento, tais achados haviam sido mencionados verbalmente por médicos do estado de Minas Gerais durante o surto de 2017 e 2018, e posteriormente publicados ^(93, 94). Ademais, já constavam as publicações ⁽⁹⁵⁻⁹⁷⁾ com relatos de alterações similares previamente.

Neste estudo, são descritos os aspectos clínicos, laboratoriais e virológicos obtidos na admissão hospitalar dos casos graves de FA internados nas unidades de terapia intensiva do HCFMUSP durante o ano de 2018 que obtiveram relação prognóstica com desfechos fatais. Diante das observações feitas nos casos sobreviventes com nova elevação de aminotransferases, questionou-se sobre este novo aspecto da doença, que também resultou em outro objetivo deste estudo.

Os dados utilizados nesta tese encontram-se publicados em dois artigos anexados ao final deste manuscrito ^(98, 99).

2.OBJETIVOS

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivos gerais

- Descrever os aspectos clínicos e laboratoriais dos casos graves de FA internados no HCFMUSP
- Descrever o acompanhamento ambulatorial posterior dos pacientes sobreviventes de FA

2.2 Objetivos específicos

- Avaliar a relação da carga viral de VFA com desfecho para óbito ou sobrevida
- Determinar marcadores associados ao desfecho fatal nos pacientes internados nas unidades de terapia intensiva do HCFMUSP durante o período de janeiro a junho de 2018.
- Caracterizar a recorrência de inflamação hepática da FA sob o ponto de vista clínico, laboratorial e histopatológico, durante o acompanhamento posterior dos pacientes acometidos pela doença em 2018 e 2019.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

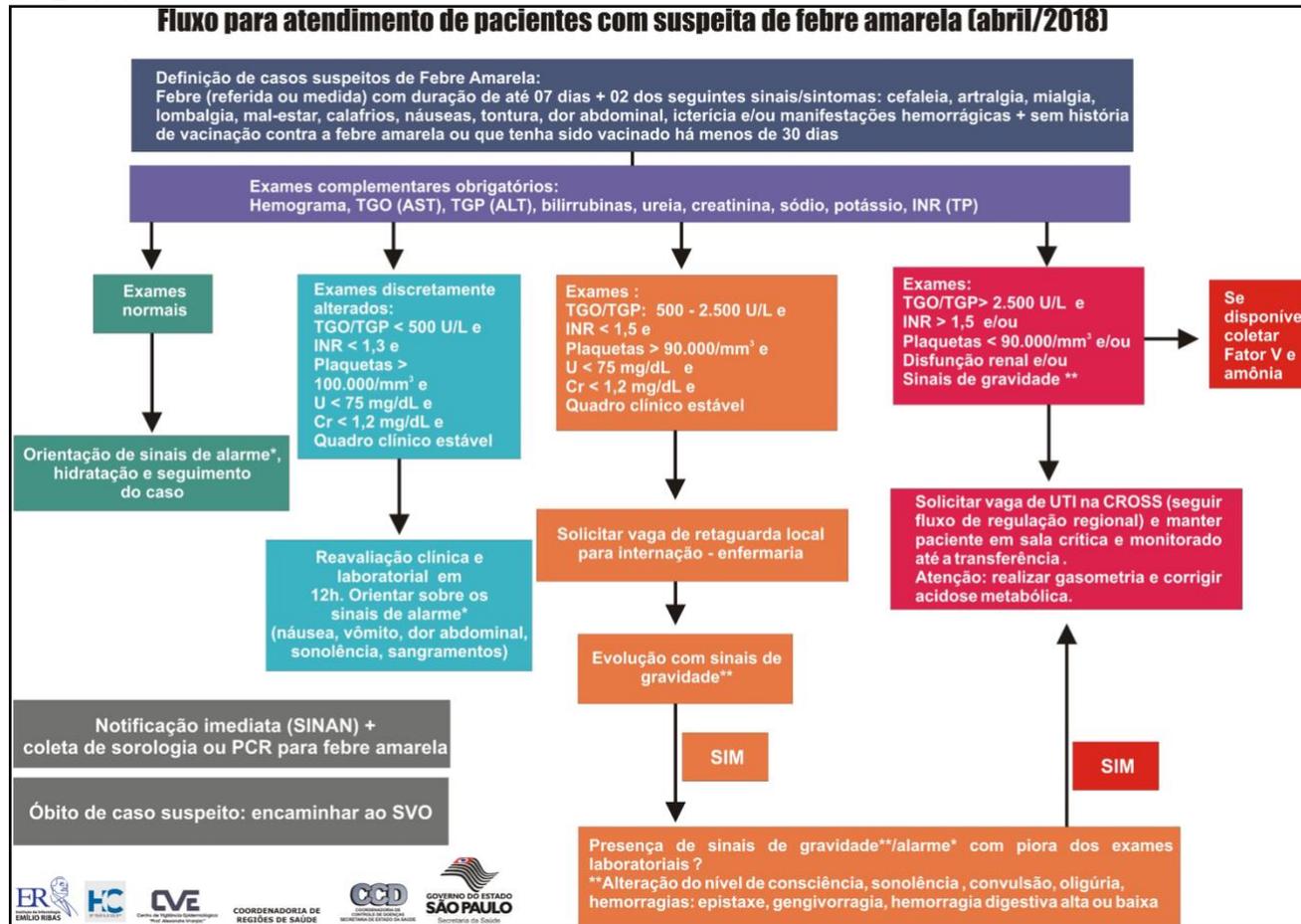
3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Centro recrutador de pacientes com FA

O Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo (HCFMUSP) é o maior hospital-escola da América Latina com atendimento público via Sistema Único de Saúde - SUS. Possui 2.400 leitos distribuídos em 8 institutos e 2 hospitais auxiliares ⁽¹⁰⁰⁾. Por dispor de tecnologia de nível quaternário para atenção à saúde, foi escolhido pela Secretaria Estadual de Saúde do estado de São Paulo como referência para os casos de FA com maior gravidade nos anos de 2018 e 2019 ⁽⁶⁸⁾.

Através da Central de Regulação de Ofertas de Serviços de Saúde (CROSS) os casos eram regulados para os serviços de referência de acordo com critérios clínicos e laboratoriais mostrados na Figura 7.

Figura 7 - Fluxo para atendimento e regulação de casos suspeitos de febre amarela para serviços de referência no estado de São Paulo, abril de 2018.



FONTE: SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DE SÃO PAULO, 2018.

3.2 Seleção de pacientes

Os casos de FA grave internados em leitos de terapia intensiva em 2018 foram selecionados para a análise de fatores prognósticos para evolução grave ⁽⁹⁸⁾. Após esta primeira publicação, os indivíduos sobreviventes de FA nos anos 2018 e 2019 que continuaram em acompanhamento ambulatorial no HCFMUSP e apresentaram recorrência de inflamação hepática foram descritos em um segundo estudo ⁽⁹⁹⁾.

3.2.1 Definição de caso

De acordo com o fluxograma feito pela SES-SP em conjunto com especialistas na área (Figura 7), os casos suspeitos de FA encaminhados ao HCFMUSP deveriam preencher os seguintes critérios:

- Procedência de área de risco para FA, com documentação de epizootias e/ou casos humanos e;
- Febre (referida ou medida) com início máximo nos 7 dias anteriores e;
- Sinais e sintomas - presença de pelo menos 2:
 - Cefaleia
 - Artralgia
 - Mialgia
 - Lombalgia
 - Mal-estar
 - Calafrios
 - Náuseas
 - Tontura
 - Dor abdominal
 - Icterícia

- Manifestações hemorrágicas
- Sem história de vacinação prévia para FA ou vacina de FA há menos de 30 dias
- Infecção pelo VFA do tipo selvagem por reação de cadeia de polimerase (RT-qPCR) em sangue e/ou urina coletados na admissão hospitalar.

Os participantes incluídos nos estudos concordaram em participar ou apresentavam a autorização de seu responsável legal, após o esclarecimento dos riscos e benefícios implícitos relacionados à participação na pesquisa por meio da assinatura do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido - TCLE (Anexo A), aprovado pela Comissão Ético-Científica do Departamento de Gastroenterologia e do Departamento de Moléstias Infecciosas e Parasitárias da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo e pela Comissão de Ética para Análise de Projetos de Pesquisa (CAPPesq) do HCFMUSP, registrados com o número CAAE 74535417.3.1001.0068 (Anexo B).

3.2.2 Critérios de inclusão

Foram incluídos neste estudo todos os pacientes internados no HCFMUSP com diagnóstico confirmado de infecção pelo VFA por RT-qPCR em 2018 e 2019. Na admissão hospitalar, os pacientes foram direcionados para internação em leitos de terapia intensiva ou enfermaria de acordo com a estratificação de gravidade dos casos. Após a alta hospitalar, foram encaminhados para acompanhamento ambulatorial.

3.2.3 Critérios de exclusão

- Resultado negativo para FA em RT-qPCR em sangue e/ou urina
- Sem internação no HCFMUSP durante o episódio agudo de FA
- Dados insuficientes em prontuário médico

- Indivíduos submetidos a transplante hepático por conta da hepatite fulminante da FA. A inclusão destes casos poderia gerar fatores conflitivos na análise, como a influência da imunossupressão pós transplante na evolução natural da doença ou em caso de óbito, se este poderia ser atribuído à FA ou ao procedimento cirúrgico.

3.3 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela

O estudo sobre fatores prognósticos ⁽⁹⁸⁾ foi realizado somente com pacientes submetidos aos cuidados intensivos atendidos nas unidades de terapia intensiva da Divisão de Gastroenterologia e da Divisão de Moléstias Infecciosas e Parasitárias do HCFMUSP e diagnóstico de FA confirmado durante o ano de 2018. Os casos foram estratificados segundo os critérios de gravidade clínica e/ou laboratorial:

- Alanina aminotransferase (ALT) ou aspartato aminotransferase (AST) > 3.000 U/L; e/ou
- Razão normalizada internacional (INR) > 1,5; e/ou
- Plaquetas <90.000/mm³; e/ou
- Disfunção renal; e/ou
- Fenômenos hemorrágicos; e/ou
- Encefalopatia; e/ou
- Instabilidade clínica

Amostras de sangue e urina foram coletadas de todos os pacientes para análise virológica e os exames laboratoriais solicitados pelas equipes médicas assistenciais. Os seguintes exames laboratoriais realizados na admissão do paciente foram compilados: creatinina, amônia, lipase, bilirrubina total, lactato, bicarbonato, AST, ALT, INR e dosagem de fator V. Os exames foram realizados na Divisão de Laboratório Central do HCFMUSP. O índice *Chronic Kidney Disease Epidemiology collaboration* (CKD-EPI) foi utilizado

para avaliação de taxa de filtração glomerular, baseado nos níveis séricos de creatinina, idade, raça e sexo, previamente descritos. A relação de AST/ALT também foi calculada e utilizada na análise.

3.4 Hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA)

Posteriormente, os pacientes sobreviventes foram acompanhados ambulatorialmente com retornos semanais enquanto houvesse alterações laboratoriais, clínicas ou enquanto fosse possível a detecção de RNA de VFA em soro ou urina.

No acompanhamento ambulatorial dos pacientes sobreviventes, a hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA) foi definida como novo aumento de AST e/ou ALT, com ou sem sintomas associados, em até seis meses após melhora ou normalização de função hepática, conforme descrição semelhante observada na hepatite A ⁽¹⁰¹⁾. Concomitantemente, novas amostras de soro e urina foram coletadas em busca de detecção de material genético viral do VFA. Quando possível, os pacientes foram submetidos a biópsia hepática percutânea.

Todos os pacientes foram acompanhados ambulatorialmente, mesmo com sintomas ou assintomáticos. Após a alta hospitalar, o acompanhamento foi realizado semanalmente caso o RNA de VFA fosse detectável em soro e/ou urina, concomitantemente com exames de bioquímica e função hepática (ALT, AST, bilirrubinas totais e frações, hemograma completo, coagulograma) sistematicamente solicitados. Após o RT-qPCR para VFA apresentar-se indetectável, os pacientes passaram a ser acompanhados mensalmente por até seis meses após a internação inicial. Após os seis meses iniciais, foram reavaliados duas vezes (aos 9 e 12 meses) ou antes, caso houvesse piora clínica no período.

3.5 Assistência à saúde durante a internação

Durante a internação, a condução clínica dos casos de FA ficou a cargo das equipes assistenciais e constituiu-se basicamente de suporte clínico e uso de medicações sintomáticas. Alguns pacientes destas casuísticas também foram incluídos em ensaio clínico randomizado para avaliação de eficácia de sofosbuvir na fase aguda da FA ⁽¹⁰²⁾.

3.6 Métodos laboratoriais

3.6.1 Detecção e quantificação do RNA do vírus da febre amarela

As reações para detecção e quantificação do RNA viral foram realizadas no Laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – LIM 07 do Departamento de Gastroenterologia do HCFMUSP.

O RNA do VFA foi isolado a partir de 250 µL de amostras de soro e urina usando o reagente TRIzol LS seguindo as instruções do fabricante (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Brand, Carlsbad, CA, EUA) e 20 µg de glicogênio livre de RNase foram adicionados à fase aquosa como um transportador de RNA. O RT-qPCR para detecção do VFA foi realizado usando o sistema RT-qPCR de uma etapa SuperScript III com DNA polimerase *Platinum Taq* (Invitrogen™, Thermo Fisher Scientific Brand, Carlsbad, CA, EUA). A região não codificante do VFA 5'RNC foi amplificada usando iniciadores e sonda específicos, como descrito anteriormente ⁽¹⁰³⁾.

Uma curva padrão de DNA sintético foi usada para quantificar os genomas do VFA. Cada ensaio foi projetado para incluir controles negativos e positivos, a curva padrão e controles de referência. Para gerar as curvas padrão sintéticas, um oligonucleotídeo de 95 pb do VFA 5'RNC foi sintetizado (5' - CTGCTAATCGCT - CAACGAACGGAT - AGATAGTGTTTA - TTGCCTAGCAAC - TCGATGATAGAT - AGCAGACCAATG - CACCTCAATTAG - CGATAT - 3'; contendo 41,1% de GC). Diluições seriadas

a partir de 10^{10} cópias/mL foram usadas para gerar a curva de padrão para os ensaios de RT-qPCR. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Quando os pacientes referiram ter sido vacinados contra a FA nos últimos 28 dias antes do início dos sintomas, e suspeitava-se de doença viscerotrópica com período de incubação plausível, foi realizado o RT-qPCR com iniciadores e sondas específicas para as cepas vacinais ⁽¹⁰⁴⁾.

As reações foram realizadas em placas de 96 poços e executadas no equipamento *7500 Fast Real-Time PCR System* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Brand, Carlsbad, CA, EUA) sob o seguinte programa de ciclagem térmica: 50°C por 30 minutos, 95°C por 2 minutos e, em seguida, 45 ciclos de 95°C por 15 segundos e 55°C por 1 minuto.

3.6.2 Sequenciamento e genotipagem do vírus da febre amarela

Para se obter fragmentos mais longos para sequenciamento nucleotídico, o gene do envelope (E) do VFA foi amplificado utilizando *primers* descritos anteriormente ⁽¹⁰⁵⁾. A RT e a primeira reação de PCR foram realizadas usando o *SuperScript® III One-Step RT- qPCR System* com *Platinum Taq High Fidelity* (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, EUA) e os *primers* YFV 975F e YFV 1312R. A segunda etapa de PCR foi realizada utilizando a *Platinum Taq DNA* polimerase (Invitrogen™, Thermo Fisher Brand, Carlsbad, EUA) e a mesma combinação de *primers*. Amostras positivas foram sequenciadas pelo método de Sanger para determinar o genótipo viral. Os produtos de PCR (317pb) foram sequenciados em um sequenciador de DNA *ABI 3500* (Applied Biosystems™, Thermo Fisher Scientific Brand, Carlsbad, CA).

A sequência obtida foi alinhada com as sequências de referência publicadas do GenBank, utilizando o software *BioEdit* (v. 7.0.8) e o programa integrado *CLUSTAL W* ⁽¹⁰⁶⁾. Uma árvore filogenética foi construída usando o método de máxima verossimilhança usando o tempo geral reversível (GTR) como modelo de substituição e 500 repetições de *bootstrap*, usando

sequências da América do Sul e África como referências dos diferentes genótipos ⁽¹⁰⁷⁾.

3.6.3 Estudo anatomopatológico

A análise histológica dos fragmentos hepáticos obtidos por biópsia percutânea com agulha foi realizada com as colorações hematoxilina-eosina, reticulina de Weigert, Perls e picrossírius. As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no laboratório de Patologia da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo conforme descritos previamente ⁽²⁹⁾ e baseadas na detecção de anticorpo policlonal IgM caprino contra antígeno de VFA, fornecido pelo Instituto Pasteur-Dakar, originalmente padronizado para ELISA e validado na diluição otimizada de 1:20.000 com controles positivos e negativos. A amplificação da reação foi realizada pelas moléculas de polímero conjugadas a peroxidase (Reveal - Biotin-Free Polyvalent HRP DAB, Spring Bioscience, cód. SPD-125) e cromógeno (Dako Liquid Di-amino-benzidina [DAB] + Substrate Chromogen System, Dako, cod. K3460).

De forma independente, o antígeno de VFA foi detectado no Instituto Adolfo Lutz (IAL), no Laboratório Central de Saúde Pública do Estado. Após desparafinização e recuperação de epítipo induzida por calor, um anticorpo policlonal anti-VFA de camundongo direcionado à cepa selvagem foi empregado (Wild, cepa SP, hiperimune, IAL - SP, Brasil), otimizado na diluição 1:10.000 com incubação por 18 horas a 4°C, conforme previamente validado com controles negativos e positivos. O sinal de amplificação foi alcançado pelo polímero conjugado com fosfatase alcalina (MACH 4, Biocare Medical, cat. M4U536), revelado pelo cromógeno Fast Red (Warp Red, Biocare Medical, WR806), que produz uma coloração vermelho-cereja. Finalmente, as lâminas foram contrastadas com Harris-hematoxilina (Merck, Darmstadt, Alemanha). Posteriormente, este último anticorpo primário na diluição 1:20.000 foi testado em amostras de fígado de casos com hepatite por outras etiologias, com resultados negativos.

3.6.4 Detecção molecular do VFA nos fragmentos provenientes de biópsias hepáticas

Amostras de biópsia hepática foram coletadas através de amostras percutâneas guiadas por ultrassom. Fragmentos recém-congelados foram estabilizados em *RNAlater* (Ambion®, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) homogeneizados com tampão de lise em tubo com pérolas de vidro que permitiram a disrupção mecânica do tecido. Em seguida, o isolamento de RNA total foi realizado utilizando o *mirVanaTM* miRNA Isolation Kit (Ambion®, Marca Thermo Fisher, Foster City, CA, EUA). Nas amostras de tecido fixadas em formalina e embebidas em parafina (FFPE), o RNA total foi isolado de dez seções de 5 µm usando o Kit de isolamento de ácido nucléico total *RecoverAll* (Ambion®, Thermo Fisher Brand, Foster City, CA, EUA). Todos os protocolos de isolamento foram realizados de acordo com as instruções do fabricante. O RNA total foi eluído em 50 µL de solução de eluição. O RNA de VFA foi amplificado por RT-qPCR usando iniciadores e sondas específicas, conforme descrito anteriormente.

3.7 Análise estatística

3.7.1 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela

Os dados clínicos e laboratoriais dos pacientes foram coletados e organizados em um banco de dados para serem utilizados na análise estatística. Para avaliar quais variáveis eram associadas com mortalidade, pacientes foram classificados em dois grupos: sobreviventes ou fatais durante a hospitalização. As variáveis contínuas foram testadas pelo teste t (diferença de médias de dois grupos independentes) e as variáveis categóricas foram testadas para associação com óbito pelo teste Qui-quadrado. Após realizar a análise univariada, as variáveis que apresentaram valor de $p < 0,20$ foram selecionadas para regressão logística binominal pelo método *backward stepwise* visando determinar quais variáveis seriam melhores preditoras de mortalidade. Em seguida, foram combinadas com método de regressão

logística usando o Wald Test para calcular o valor de p para cada coeficiente da variável que entrou no modelo para cada fase da regressão.

A razão de probabilidades (*Odds ratio – OR*) e o intervalo de confiança de 95% foram estimados para cada variável incluída no processo de regressão logística. O teste de Hosmer e Lemeshow foi aplicado para verificar se o número de óbitos encontrado e esperado foi significativamente diferente em cada etapa da regressão logística. O coeficiente de determinação de *Nagelkerke* (R^2) foi calculado para cada etapa do processo de regressão logística, a fim de avaliar o grau de explicação da morte pela combinação de variáveis em cada etapa da regressão logística.

As curvas ROC (*Receiver Operating Characteristic*) e as respectivas áreas sob a curva foram calculadas para variáveis que permaneceram estatisticamente significativas na previsão da morte na última etapa do processo de regressão logística. As curvas de sobrevivência foram obtidas pelo teste de Kaplan-Meier (K-M) usando as mesmas variáveis independentes selecionadas na regressão logística em sua última etapa. O teste de Breslow foi utilizado para comparação entre as curvas. Todas as análises estatísticas foram realizadas no software SPSSTM versão 21.0.

3.7.2 Hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA)

Nos pacientes com HT-FA, os dados coletados foram analisados de maneira descritiva. Variáveis categóricas foram expressas em números e porcentagens. Variáveis quantitativas foram descritas em medianas e de variação interquartil. Os pacientes com HT-FA foram comparados com o grupo de pacientes sem o novo aumento de aminotransferases pelo teste t de Student.

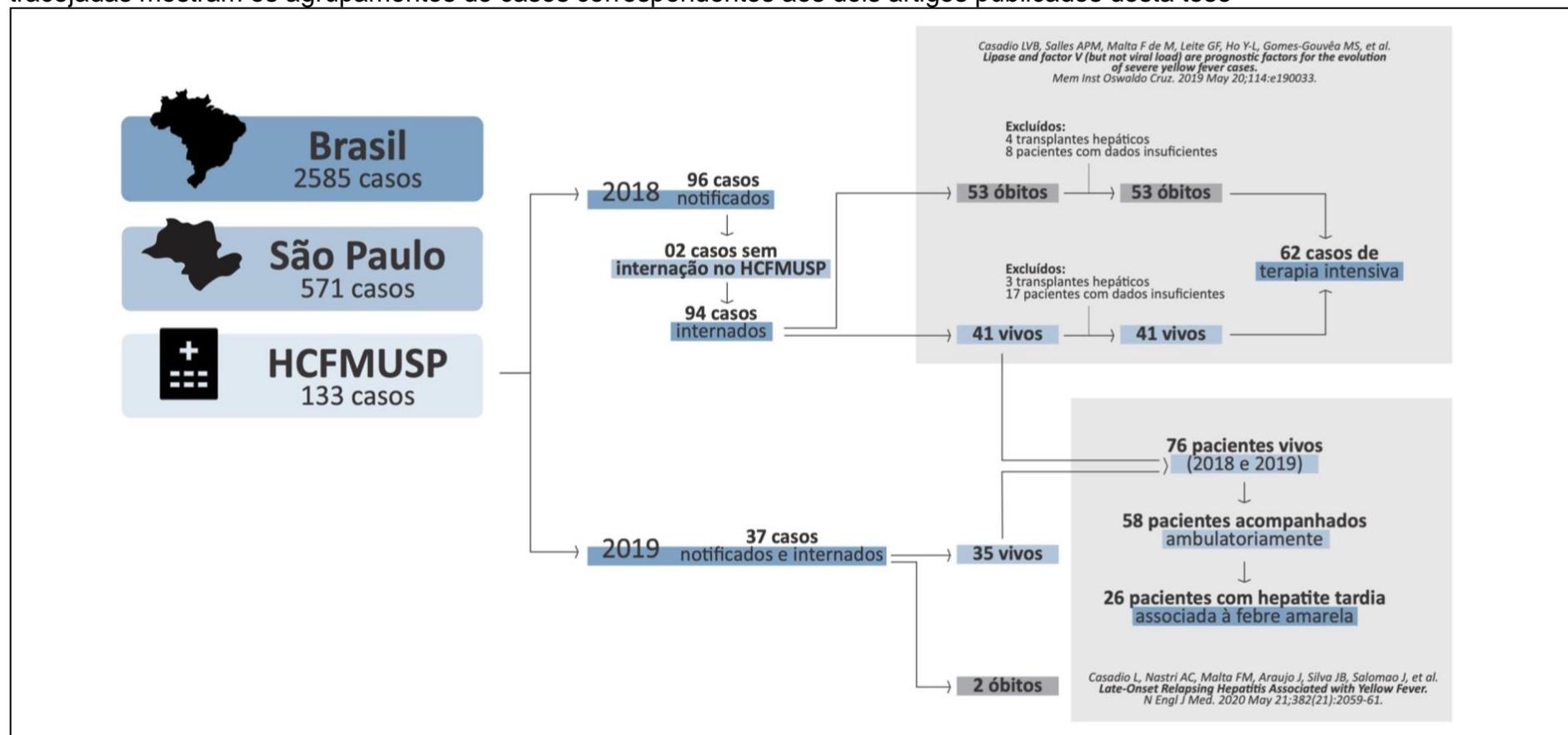
Para as variáveis categóricas, o teste Yates-qui-quadrado ou teste exato de Fisher foram utilizados quando apropriados. Resultados foram considerados significantes se $p < 0,05$. As análises estatísticas foram feitas usando o software EpiInfo™ versão 7.2.3.1.

4.RESULTADOS

4. RESULTADOS

Os pacientes incluídos neste estudo ao longo dos anos de 2018 e 2019 foram agrupados em duas publicações diferentes. A figura 9 mostra a alocação dos casos de FA em cada trabalho de acordo com os critérios de inclusão e exclusão.

Figura 8 - Fluxograma de seleção de pacientes internados com febre amarela no HCFMUSP nos anos de 2018 e 2019. Quadros verdes representam pacientes sobreviventes e quadros em vermelho os casos que foram a óbito. Os sobreviventes dos dois anos acompanhados ambulatorialmente são representados nos quadros azuis. As áreas em cinza delimitadas pelas linhas tracejadas mostram os agrupamentos de casos correspondentes aos dois artigos publicados desta tese



4.1 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela

Em 2018, 96 casos de FA foram notificados pelo Núcleo de Vigilância Epidemiológica, dos quais 94 foram internados no HCFMUSP. Destes, foram excluídos 7 pacientes submetidos ao transplante hepático (4 falecidos e 3 sobreviventes) e 25 indivíduos com dados incompletos em prontuários (8 falecidos e 17 sobreviventes). Dos pacientes internados com FA grave em leito de terapia intensiva, 62 apresentaram todos os dados laboratoriais completos disponíveis. Os dados laboratoriais e demográficos dos 62 pacientes incluídos no estudo encontram-se na Tabela 2.

O RNA viral de FA foi detectado em todos os pacientes. Em 59 pacientes o RNA foi detectado em amostras de soro, e em 3 pacientes o RNA foi detectado apenas em amostras de urina. Apenas um paciente havia sido vacinado anteriormente contra a FA nos últimos 28 dias, mas o RT-qPCR foi negativo para cepa vacinal e positivo para cepa selvagem.

Tabela 2 - Dados demográficos e laboratoriais de 62 pacientes com febre amarela grave, classificados de acordo com o desfecho sobreviventes ou óbito. Análise univariada.

Parâmetro	Vivos (n = 21)	Óbitos (n = 41)	Valor de <i>p</i>
Idade (anos), mediana (AIQ)	42 (27,5 – 48)	45 (35,5 – 58)	0,208
Gênero, n (%) masculino	16 (32%)	34(68%)	0,525
Feminino	5 (41,7%)	7 (58,3%)	
Dias de sintomas *, mediana (AIQ)	6 (4,5 – 7)	5 (4 – 7)	0,489
ALT (U/L), mediana (AIQ)	2,694 (1,416 – 3,642)	5,009 (3,242 – 7,734)	< 0,0001
AST (U/L), mediana (AIQ)	3,384 (2,333 – 5,097)	11,350 (6752 – 15,820)	< 0,0001
AST/ALT, mediana (AIQ)	1,33 (1,16 – 1,7)	2,04 (1,67 – 2,77)	< 0,0001
Bilirrubinas (mg/dL), mediana (AIQ)	3,38 (1,18 – 5,58)	5,85 (4,16 – 8,09)	< 0,0001
CKD– EPI (mL min ⁻¹ 1,73 m ⁻²), mediana (AIQ)	85 (65,5 – 114)	11 (6 – 25)	< 0,0001
Amônia (μmol/L), mediana (AIQ)	53 (41,5 – 62,5)	90 (62,5 – 141,5)	< 0,0001
Lipase (U/L), mediana (AIQ)	66 (49 – 139,5)	531 (159 – 1560)	< 0,0001
Fator V (%), mediana (AIQ)	90 (62 – 121,5)	32 (11 – 42,5)	< 0,0001
INR, mediana (AIQ)	1,33 (1,15 – 1,51)	2,5 (1,97 – 3,51)	< 0,0001
Lactato (mg/dL), mediana (AIQ)	16 (11 – 21,5)	39 (24,5 – 61,75)	< 0,0001
Bicarbonato (mmol/L), mediana (AIQ)	20,7 (18,95 – 23,4)	14,7 (11,7 – 18,7)	< 0,0001
Carga viral (log ₁₀ cópias/mL), mediana (AIQ)	6,1 (5,47 – 7,05)	6,1 (5,53 – 7,22)	0,623

A mediana da carga viral foi de 6,71 log₁₀ cópias/mL (variação de 3,20 a 9,93 log₁₀ cópias/mL) entre os pacientes hospitalizados durante os primeiros cinco dias de sintomas e 5,77 log₁₀ cópias/mL (variação de 3,40 a 8,48 log₁₀ cópias/mL) entre os pacientes que foram hospitalizados com mais de 5 dias do início dos primeiros sintomas ($p = 0,0002$, IC 95%). Por outro lado, como mostrado na Tabela 2, as medianas da carga viral não foram diferentes entre os pacientes que sobreviveram e os que faleceram.

Os pacientes que receberam alta hospitalar continuaram com acompanhamento no ambulatório e foram acompanhados por pelo menos 1 ano. Sete pacientes tiveram amostras de urina e sangue examinados semanalmente quanto à presença de RNA viral até o teste ser negativo. Após o início dos sintomas, viremia e virúria estavam presentes por um período máximo de 28 e 47 dias, respectivamente.

4.1.1 Análise univariada

Após análise univariada comparando pacientes que sobreviveram à internação e aqueles que faleceram, 12 variáveis explicativas foram selecionadas para regressão logística ($p < 0,20$) como preditoras de morte: idade, CKD-EPI, amônia, lipase, fator V, bilirrubina total, INR, AST, ALT, razão AST/ALT, lactato e bicarbonato (Tabela 2).

4.1.2 Regressão logística

A regressão logística binomial foi realizada usando a morte como variável dependente e as 12 variáveis independentes listadas acima. Após 11 etapas, apenas 2 variáveis independentes permaneceram estatisticamente significativas no modelo de regressão logística: lipase (OR = 1,018; IC95% = 1,007-1,030; $p = 0,002$) e fator V (OR = 0,955; IC95% = 0,929-0,982; $p = 0,001$). Pelo modelo, a lipase combinada ao fator V explicou 77,8% (Nagelkerke R^2) da previsão de morte por FA e classificou corretamente 88,5% dos casos de morte ou sobrevivência. A razão AST/ALT foi excluída na 10ª etapa do processo de regressão regressiva (OR = 3,790; IC 95% = 0,958-14,996; $p = 0,058$). Os resultados completos da regressão logística são mostrados na Tabela 3.

Tabela 3 Resultados completos da regressão logística binomial, métodos *backward stepwise*, mostrando os testes estatísticos que avaliam a significância dos coeficientes das variáveis e a qualidade do modelo para cada etapa do processo

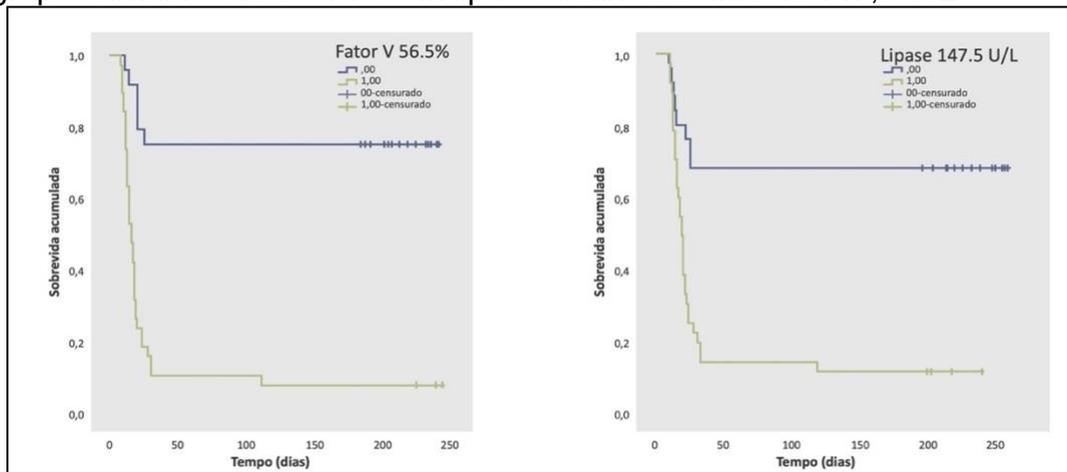
Etapa	Variáveis do modelo	Coeficiente Variável	Teste Wald para coeficientes		Razão de probabilidades	Intervalo de confiança 95%	Nagelkerke R ²	Hosmer & Lemeshow		Previsão correta (%)		
			z	p				χ^2	p	Óbitos	Vivos	Total
1	Idade	0,108	1,962	0,161	1,113	0,958 – 1,294	0,914	20,677	0,004	97,5	95,2	96,7
	CKD	0,050	1,207	0,272	1,051	0,962 – 1,149						
	Amônia	0,092	1,448	0,229	1,096	0,944 – 1,274						
	Lipase	0,041	4,388	0,036	1,042	1,003 – 1,082						
	Fator V	-0,149	3,007	0,083	0,862	0,728 – 1,020						
	Bilirrubinas	-0,295	0,167	0,683	0,744	0,181 – 3,067						
	INR	2,608	1,478	0,224	13,573	0,203 – 909,12						
	ALT	-0,001	0,467	0,494	0,999	0,997 – 1,001						
	AST	0,00002	0,002	0,964	1,000	0,999 – 1,001						
	AST/ALT	3,162	1,569	0,210	23,609	0,168 – 3324,3						
	Lactato	-0,231	3,455	0,063	0,794	0,622 – 1,013						
	Bicarbonato	-0,582	2,204	0,138	0,559	0,259 – 1,205						
	2	Idade	0,108	2,196	0,138	1,115						
CKD		0,051	1,543	0,214	1,052	0,971 – 1,140						
Amônia		0,093	1,527	0,217	1,097	0,947 – 1,271						
Lipase		0,041	4,589	0,032	1,042	1,003 – 1,081						
Fator V		-0,149	3,073	0,080	0,861	0,729 – 1,018						
Bilirrubinas		-0,292	0,166	0,683	0,747	0,183 – 3,041						
INR		2,646	1,788	0,181	14,100	0,292 – 681,94						
AST		-0,001	2,089	0,148	0,999	0,998 – 1,000						
AST/ALT		3,095	2,351	0,125	22,088	0,422 – 1154,72						
Lactato		-0,231	3,509	0,061	0,794	0,623 – 1,011						
Bicarbonato		-0,584	2,298	0,130	0,558	0,262 – 1,187						

Etapa	Variáveis do modelo	Coeficiente Variável	Teste Wald para coeficientes		Razão de probabilidades	Intervalo de confiança 95%	Nagelkerke R ²	Hosmer & Lemeshow		Previsão correta (%)		
			z	p				χ ²	p	Óbitos	Vivos	Total
3	Idade	0,104	2,251	0,134	1,110	0,969 – 1,271	0,913	21,527	0,003	97,5	95,2	96,7
	CKD	0,052	1,566	0,211	1,053	0,971 – 1,142						
	Amônia	0,094	1,673	0,196	1,099	0,953 – 1,268						
	Lipase	0,043	4,816	0,028	1,044	1,005 – 1,084						
	Fator V	-0,171	5,180	0,023	0,843	0,727 – 0,976						
	INR	2,371	1,648	0,199	10,708	0,287 – 399,97						
	AST	-0,001	2,939	0,086	0,999	0,998 – 1,000						
	AST/ALT	3,398	2,919	0,088	29,916	0,606 – 1476,07						
	Lactato	-0,252	4,401	0,036	0,777	0,614 – 0,984						
	Bicarbonato	-0,541	2,316	0,128	0,582	0,290 – 1,169						
4	Idade	0,048	0,928	0,335	1,050	0,951 – 1,158	0,899	1,416	0,994	97,5	90,5	95,1
	Amônia	0,052	0,938	0,333	1,053	0,949 – 1,169						
	Lipase	0,028	4,778	0,029	1,028	1,003 – 1,054						
	Fator V	-0,123	4,768	0,029	0,884	0,792 – 0,988						
	INR	2,150	1,214	0,271	8,584	0,187 – 393,1						
	AST	-0,001	1,570	0,210	0,999	0,999 – 1,000						
	AST/ALT	1,973	1,722	0,189	7,191	0,378 – 136,91						
	Lactato	-0,175	3,972	0,046	0,839	0,707 – 0,997						
	Bicarbonato	-0,163	1,101	,0294	0,849	0,626 – 1,152						
	5	Amônia	0,056	1,241	0,265	1,058						
Lipase		0,026	5,207	0,022	1,026	1,004 – 1,049						
Fator V		-0,107	4,848	0,028	0,898	0,817 – 0,988						
INR		1,722	0,887	0,346	5,596	0,155 – 201,715						
AST		-0,001	1,355	0,244	0,999	0,999 – 1,000						
AST/ALT		2,645	3,844	0,050	14,087	1,001 – 198,292						
Lactato		-0,175	3,992	0,046	0,840	0,707 – 0,997						
Bicarbonato		-0,129	0,935	0,333	0,879	0,677 – 1,141						

Etapa	Variáveis do modelo	Coeficiente Variável	Teste Wald para coeficientes		Razão de probabilidades	Intervalo de confiança 95%	Nagelkerke R ²	Hosmer & Lemeshow		Previsão correta (%)		
			z	p				χ ²	p	Óbitos	Vivos	Total
6	Amônia	0,057	1,764	0,184	1,059	0,973 – 1,151	0,878	2,544	0,960	95,0	90,5	93,4
	Lipase	0,022	4,749	0,029	1,022	1,002 – 1,043						
	Fator V	-0,091	5,093	0,024	0,913	0,844 – 0,988						
	AST	0,000191	0,396	0,529	1,000	0,999 – 1,000						
	AST/ALT	2,819	4,860	0,027	16,768	1,367 – 205,637						
	Lactato	-0,146	3,775	0,052	0,864	0,746 – 1,001						
	Bicarbonato	-0,124	1,119	0,290	0,883	0,702 – 1,112						
7	Amônia	0,043	1,506	0,220	1,043	0,975 – 1,117	0,875	2,597	0,957	97,5	90,5	95,1
	Lipase	0,019	5,791	0,016	1,019	1,004 – 1,035						
	Fator V	-0,077	6,383	0,012	0,926	0,872 – 0,983						
	AST/ALT	2,675	4,415	0,036	14,516	1,197 – 176,047						
	Lactato	-0,122	4,541	0,033	0,885	0,791 – 0,990						
	Bicarbonato	-0,150	1,856	0,173	0,860	0,693 – 1,068						
8	Lipase	0,018	5,842	0,016	1,018	1,003 – 1,034	0,859	6,691	0,570	92,5	90,5	91,8
	Fator V	-0,078	7,483	0,006	0,925	0,875 – 0,978						
	AST/ALT	2,798	4,519	0,034	16,404	1,244 – 216,353						
	Lactato	-0,080	2,530	0,112	0,923	0,837 – 1 019						
	Bicarbonato	-0,064	0,638	0,424	0,938	0,802 – 1,097						
9	Lipase	0,019	6,320	0,012	1,019	1,004 – 1,034	0,854	6,840	0,554	92,5	85,7	90,2
	Fator V	-0,081	8,888	0,003	0,923	0,875 – 0,973						
	AST/ALT	2,254	5,360	0,021	9,523	1,413 – 64,178						
	Lactato	-0,084	3,377	0,066	0,920	0,841 – 1,006						
10	Lipase	0,013	5,964	0,015	1,013	1,003 – 1,023	0,837	2,889	0,941	92,5	85,7	90,2
	Fator V	-0,066	8,576	0,003	0,936	0,895 – 0,978						
	AST/ALT	1,332	3,605	0,058	3,790	0,958 – 14,996						
11	Lipase	0,018	9,456	0,002	1,018	1,007 – 1,030	0,778	2,234	0,973	87,5	90,5	88,5
	Fator V	-0,046	10,243	0,001	0,955	0,929 – 0,982						

O valor estimado de corte de lipase que maximizou a sensibilidade e a especificidade para a previsão da morte foi de 147,5 U / L (AUC = 0,879). O valor de corte estimado do fator V que maximizou a sensibilidade e a especificidade para a previsão de óbito foi de 56,5% (AUC = 0,913). Usando esses valores de corte para lipase e fator V, curvas K-M foram construídas para essas variáveis. Nos dois casos, a comparação entre as curvas pelo teste de Breslow mostrou relevância estatística ($p < 0,001$). (Figura 9).

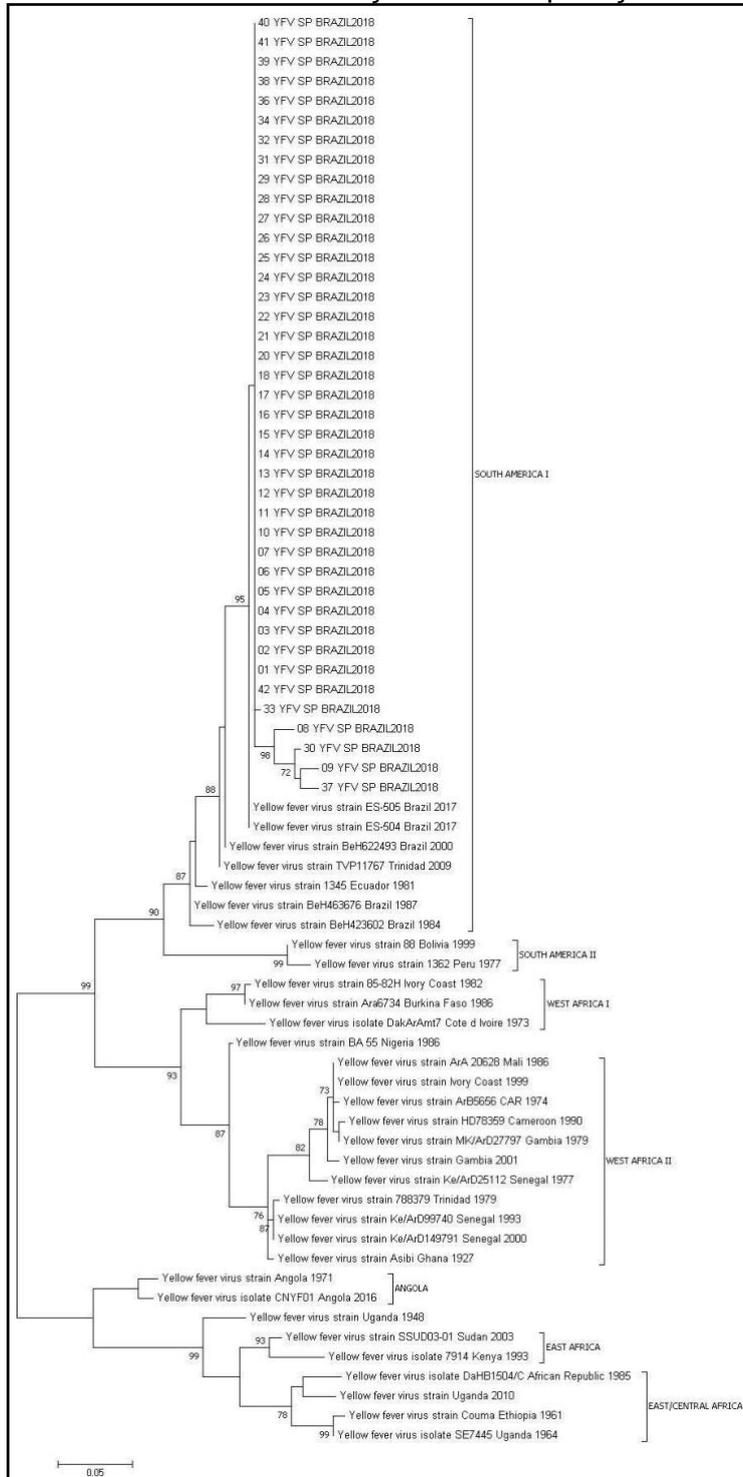
Figura 9 - Painel à esquerda: curvas de sobrevida de Kaplan-Meier comparando os grupos divididos de acordo com o fator V abaixo e acima de 56,5%. Painel à direita: Curvas de sobrevida de Kaplan-Meier comparando grupos divididos de acordo com lipase abaixo e acima de 147,5 U/L



4.1.3 Análise filogenética do gene do envelope do VFA e genotipagem

Todas as cepas isoladas foram caracterizadas como clado sul-americano I e subclado I E. As amostras de São Paulo se agruparam com as cepas encontradas em 2017 nos estados brasileiros de Minas Gerais e Espírito Santo (Figura 10) (17, 18, 45, 70, 82, 108–111).

Figura 10 Genotipagem do vírus da febre amarela baseada em análise filogenética usando o método de máxima verossimilhança usando o tempo geral reversível como modelo de substituição e 500 replicações *bootstrap*.



4.2 Hepatite tardia associada à febre amarela

4.2.1 Descrição clínico-laboratorial

Nos anos de 2018 e 2019, dos 71 pacientes sobreviventes após a FA aguda, 58 foram acompanhados no ambulatório de Moléstias Infecciosas do HCFMUSP e 26 desenvolveram HT-FA (45% - 26 de 58 pacientes). O aumento da ALT foi percebido de 25 a 128 dias (mediana de 41 dias) após o início do quadro agudo inicial de FA. Idade, gênero, gravidade da doença e tratamento de suporte utilizado na internação não foram diferentes entre os grupos com e sem HT-FA. A Tabela 4 apresenta os dados laboratoriais e clínicos de ambos os grupos.

Tabela 4 Características dos 58 pacientes com febre amarela, de acordo com o status em relação à hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA)

	Com HT-FA n=26	Sem HT-FA n=32	Diferença de proporções (IC 95%) † ponts percentuais
Características dos pacientes e cuidados de saúde durante a hospitalização por FA			
Sexo masculino – n (%)	23 (88)	25 (78)	10 (-9 a 29)
Idade (anos) – média (AIQ)	38 (28 – 48)	44 (29 – 51)	–
Índice de massa corporal – média (AIQ) ‡	24 (22 – 31)	24 (22 – 28)*	–
Pico ALT >3000 U/L durante a fase aguda – n (%)	6 (23)	10 (31)	-8 (-30 a 14)
Tratamento de suporte – n (%)			
Hospitalização em terapia intensiva	18 (69)	27 (84)	-15 (-36 a 6)
Ventilação mecânica	6 (23)	4 (12)	10 (-92 a 30)
Troca plasmática	6 (23)	8 (25)	2 (-23 a 20)
Hemodiálise	5 (19)	8 (25)	5 (-27 a 15)
Uso de sofosbuvir	10 (38)	12 (38)	0 (-24 a 26)
Duração de hospitalização (dias) – média (AIQ)	10 (7 – 20)**	10 (8 – 25)	

* Dados disponíveis somente de 31 pacientes. ** Dados disponíveis somente de 25 pacientes

Valores com o símbolo “±”: médias ± desvio padrão. ALT: alanina aminotransferase; AIQ: amplitude interquartil; FA: febre amarela

† A diferença é relatada para pacientes com hepatite recidivante de início tardio, em comparação com pacientes sem essa condição.

‡ O índice de massa corporal é o peso em quilogramas dividido pelo quadrado da altura em metros.

Tabela 5 - Características clínicas dos pacientes com hepatite tardia associada à febre amarela (HT-FA)

Características clínicas dos pacientes com hepatite tardia associada à febre amarela (n = 26)	
Dias entre o início do quadro agudo de FA até o novo pico de ALT – média ± DP	75 ± 22
Dias entre a alta hospitalar até o novo pico de ALT – média ± DP	59 ± 19
Pico de ALT – n (%)	
<300 U/L	7 (27)
300–1000 U/L	10 (38)
>1000 U/L	9 (35)
Duração de ALT alterada (dias) – mediana (mínimo e máximo)	115 (51–176)
Bilirrubinas totais - n (%)	
0.1–1.0 mg/dl	4 (15)
1,1-1,49 mg/dL	11 (42)
1,5-5,0 mg/dL	8 (31)
5,1-10 mg/dL	1 (4)
>10 mg/dL	2 (8)
Presença de sintomas - n (%)	
Sem sintomas	15 (58)
Dor em abdome superior	8 (31)
Astenia	7 (27)
Mal-estar	5 (19)
Náusea	3 (12)
Gosto amargo	2 (8)
Mialgia	1 (4)
Vômitos	1 (4)
Dispepsia	1 (4)

Valores com o símbolo “±”: médias ± desvio padrão (DP). ALT: alanina aminotransferase

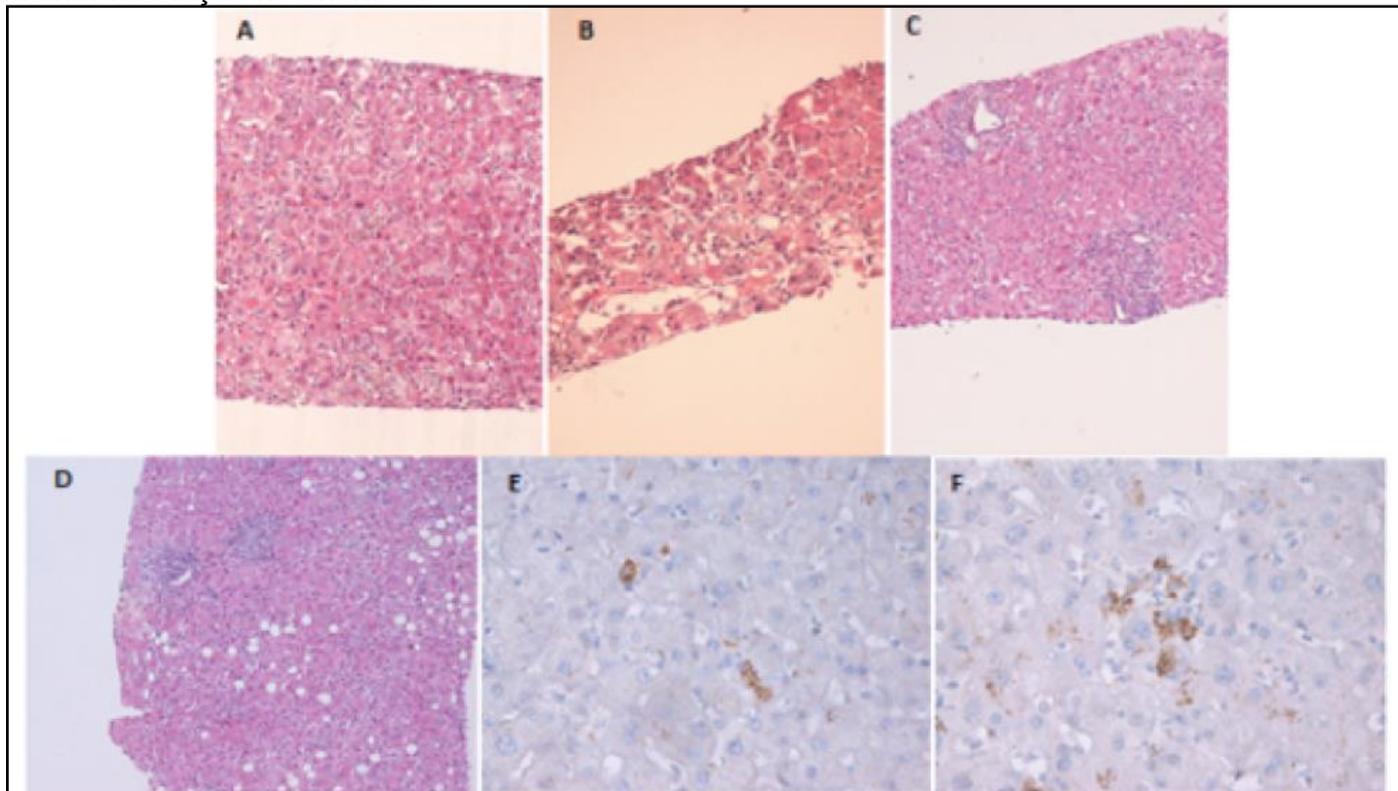
Os sintomas referidos pelos pacientes com HT-FA foram moderados, ou seja, interferiam na qualidade de vida diária, mas não impediam atividades rotineiras. Apenas um dos pacientes referiu redução da capacidade de realizar suas atividades diárias. Onze pacientes (42%) relataram pelo menos 1 sintoma e os mais comuns foram dor no abdome superior e astenia. A tabela 5 mostra os sintomas e alterações laboratoriais somente nos pacientes com HT-FA. Somente um paciente apresentou RT-qPCR detectável em soro após retorno do aumento de aminotransferases. Dos 26 pacientes, 6 receberam prednisona (dose inicial 40 mg/dia), mas o desfecho não foi diferente dos demais pacientes que não receberam corticosteróides ($p = 0,95$).

Na investigação de outras causas de lesão hepática aguda, 20 de 26 pacientes apresentavam IgG reagente para hepatite A, todos com IgM não reagente; 12 pacientes com sorologia reagente somente para Anticorpo contra o antígeno de superfície da Hepatite B (anti-HBs) e posteriormente os demais encaminhados para adequação vacinal para faixa etária. Na investigação de causas de hepatites autoimunes, o anticorpo antimúsculo liso foi reagente em 6 pacientes (títulos 1/20 a 1/40, padrão vascular e glomerular). Somente um paciente apresentou fator antinúcleo (FAN) reagente (título 1/80, padrão pontilhado).

4.2.2 Descrição anatomopatológica

As 9 biópsias hepáticas provenientes de punção com agulha Gauge-16 apresentavam predomínio notável de necroinflamação, vários pontos de necrose focal, apoptose e degeneração hidrópica encontradas em todas as zonas lobulares, mas sem a predominância de acometimento médio-zonal típico da FA. A hipercelularidade e hipertrofia das células de Kupffer foram marcantes em todos os casos, juntamente com número variável de leucócitos mononucleares e alguns eosinófilos. Necrose confluyente foi encontrada em 5 casos. Embora o edema portal e a inflamação moderada com transbordamento tenham sido moderados em 3 casos e focais em outros 2 casos, hepatite de interface ou fibrose portal não foram evidentes em nenhum caso. Apenas um caso, com pequena inflamação, apresentou esteatose macrovesicular em 40% dos hepatócitos (Figura 11, A-D). A pesquisa imunohistoquímica do antígeno VFA foi positiva em todos os casos, mas, diferentemente da FA típica, a principal imunomarcação foi encontrada no citoplasma das células de Kupffer e apenas em quantidades mínimas nos hepatócitos necroapoptóticos (Figura 11 E, F). Todos os pacientes, exceto um, apresentavam RNA de VFA detectável nos tecidos de amostra analisados. As imagens da Figura 11 encontram-se em maior resolução no Anexo C.

Figura 11 - A. Padrão típico de “hepatite lobular” com apoptose e necrose focal de hepatócitos. As células de Kupffer são hipertróficas; B. Necrose confluyente permeada por leucócitos diversos, mono e polimorfonucleares. As células de Kupffer hipertróficas são visualizadas em sinusóides dilatados; C. Edema portal moderado e infiltrado inflamatório misto apresentam focos de transbordamento; D. Esteatose macrovesicular, não reminiscente de febre amarela aguda, foi encontrada em apenas um caso, com inflamação lobular e portal mínima; E. Detecção imuno-histoquímica do antígeno da febre amarela (FA-Ag) quase restrita ao citoplasma das células de Kupffer hipertróficas nesta área de inflamação lobular mínima. F. FA-Ag imuno-corado. Imagens em melhor resolução no anexo C.



5.DISSCUSSÃO

5. DISCUSSÃO

Durante os anos de 2018 e 2019, foram notificados 2.585 casos de FA no Brasil e 571 casos no estado de São Paulo com 133 destes internados no HCFMUSP ^(30, 56, 83, 84). Em 2018, nos 62 casos de FA grave internados em leito de terapia intensiva avaliamos os fatores prognósticos para evolução do óbito e as variáveis relacionadas com o prognóstico letal. Dos casos sobreviventes de 2018 e 2019, originou-se a segunda parte deste trabalho com a descrição de novo aumento de aminotransferases, acompanhado ou não de sintomas, em pacientes sobreviventes ao episódio inicial de FA, ocorrência denominada hepatite tardia associada à FA (HT-FA).

A FA é uma doença ainda responsável por epidemias em regiões da América Latina e África subsaariana, com grande contingente populacional em áreas para risco da patologia e com cobertura vacinal variável de acordo com as condições demográficas e econômicas dos países em questão. Embora seja difícil estimar a verdadeira incidência e mortalidade dadas as características espectrais da doença, os casos que requerem hospitalização podem evoluir rápida e gravemente para desfechos fatais, exigindo intervenções imediatas e de alta complexidade. Prever a probabilidade de evolução grave através da mensuração das alterações clínicas e laboratoriais e estratificar disfunções orgânicas auxilia a distinguir casos de gravidade potencial para serviços de referência.

O direcionamento de estruturas de saúde e cuidados apropriados para cada nível de complexidade devem ser orientados de acordo com a gravidade dos casos. Em tais locais, haveria disponibilidade de suporte avançado de vida e leitos de terapia intensiva, bem como outras terapias de suporte específico como troca plasmática, reposição de hemocomponentes, ventilação mecânica, diálise e transplante hepático. Estes recursos constituem uma demanda financeira considerável e por centros de referência especializados, com atendimento terciário-quaternário. Prognosticar a

evolução dos casos graves de FA possibilitaria melhor distribuição e uso racional destes recursos já entendidos como escassos nos sistemas de saúde.

A partir do momento que são avaliados com potencial de gravidade, os casos de FA devem ser internados para monitorização intensiva com vigilância ativa e sistemática de disfunções de múltiplos órgãos, especialmente com a execução de exames que avaliem a evolução da coagulopatia da FA. Intervenções para evitar a descompensação com fenômenos hemorrágicos podem ser um dos alvos terapêuticos promissores nessa população específica de pacientes. Paralelamente, os casos sobreviventes à fase aguda inflamatória da doença necessitam de acompanhamento em serviços especializados para monitorização de possíveis sequelas decorrentes da internação hospitalar ou da própria doença em si.

Após os anos de 2018 e 2019, foi possível abordar a FA sob a ótica dos conhecimentos atuais em terapia intensiva, biologia molecular, anatomia patológica e com o monitoramento em tempo real de casos humanos e epizootias.

A epidemia de FA nos anos de 2018 e 2019 é sem precedentes na história moderna brasileira. O número de óbitos e a população exposta à doença sem vacinação prévia e a migração da incidência dos casos pelo território brasileiro desafiou autoridades sanitárias para antecipação de vacinação de bloqueio em locais prováveis para as próximas infecções. Embora haja relatos de surtos prévios de FA no Brasil, desde o início do século XX a circulação do vírus estava restrita somente a áreas da região amazônica até meados de 2015 ⁽⁷²⁾.

5.1 Apresentação clínica distinta e mortalidade em casos internados

Nos anos de 2018 e 2019, os pacientes referenciados ao Hospital das Clínicas com diagnóstico confirmado de FA apresentavam quadro clínico e laboratorial diferentes do descrito na literatura clássica ^(14, 25, 112), com evolução rápida de apresentação oligossintomática para sonolência e/ou crises convulsivas, manifestações hemorrágicas e choque franco, alterações pouco responsivas às medidas de suporte clínico empregadas resultando em óbito frequentemente. Este desfecho dos casos graves de FA considera-se multifatorial: choque hemorrágico pela coagulopatia, crises convulsivas com edema cerebral, acidose metabólica refratária e disfunções de múltiplos órgãos e sistemas, em concordância com estudos semelhantes publicados na mesma época ^(30, 31, 113).

Em publicações consagradas da fisiopatogenia da FA ^(14, 25, 112) a doença é dividida em fases distintas. A fase crítica de intoxicação, precedida pela fase de remissão, seria caracterizada por alterações clínicas e laboratoriais graves e viremia ausente. Em nossa experiência, a remissão não foi percebida e a viremia seguiu detectável durante a fase de intoxicação, diferentemente da previamente descrita detecção viral em sangue limitada até o aproximadamente a primeira semana de sintomas. Já a detecção do RNA viral na urina, embora já padronizada para diagnóstico de FA ⁽⁶⁵⁾, mostrou-se prolongada conforme demonstrado em outros estudos do mesmo período ^(64, 114, 115).

Estes fatos confrontam esta descrição consolidada da FA como uma doença marcadamente bifásica e com viremia de curta duração. Esta percepção é também consequência do acesso a técnicas de biologia molecular modernas e mais sensíveis do que em períodos anteriores, onde os casos de FA puderam ser acompanhados em tempo real com técnicas de amplificação de ácidos nucleicos para a detecção e quantificação viral.

A descrição clássica da FA consiste em icterícia febril e a vigilância de casos suspeitos antes baseava-se na descrição sindrômica. Desde os

relatos antigos do período brasileiro colonial, aos relatos de surtos de FA no sul dos EUA e América Latina, a icterícia é cardinal, muitas vezes acompanhada posteriormente de vômitos enegrecidos. O próprio nome da doença — febre amarela — pressupõe a presença de icterícia para o diagnóstico clínico. Previamente ao período descrito neste trabalho, os casos atendidos nos serviços de referência para doenças infecciosas em São Paulo eram casos pontuais de viajantes contaminados por ausência de vacinação adequada para FA ou não responsivos a vacinações prévias. Quando ocorria a admissão em algum serviço de saúde, os casos muitas vezes já se encontravam ictericos e o período inicial já havia passado. Em nossa casuística, a icterícia foi detectada de maneira mais tardia do que o esperado, principalmente nos pacientes que sobreviveram aos dias iniciais da doença e aos desafios de uma internação prolongada em terapia intensiva com os riscos inerentes a este cenário.

Embora a mortalidade da FA nos estudos varie consideravelmente a depender do tipo de população estudada, os casos incluídos neste trabalho são os de maior gravidade e, conseqüentemente, maior mortalidade nesta população de pacientes críticos. Entretanto, tal seleção de pacientes provavelmente representa uma parcela menor do total de infectados. Os critérios para referenciamento dos casos com potencial de gravidade foram definidos inicialmente por um conjunto de especialistas e consideravam alterações laboratoriais em exames rotineiros disponíveis em locais com recursos tecnológicos escassos. Assim, é provável que haja uma parte da população no mesmo local e período que os pacientes incluídos, também infectados pelo VFA e apresentaram casos mais brandos da doença, sem necessidade de procura por serviço de saúde especializado.

5.2 Fatores de risco para óbito na FA

Determinar os fatores de risco para discriminar quais pacientes tenderiam a evoluir para forma crítica da doença, quais seriam os sinais de alarme para febre amarela grave e como detectá-los precocemente é um dos objetivos deste estudo. Apesar da evolução para óbito ou sobrevida possa ser multifatorial, é possível identificar com antecedência os pacientes com potencial gravidade, através da correlação das variáveis clínicas e laboratoriais com o desfecho óbito. Na análise univariada, as variáveis preditoras de morte – idade, CKD-EPI, amônia, lipase, fator V, bilirrubina total, INR, AST, ALT, razão AST/ALT, lactato e bicarbonato, apresentam consonância com estudos semelhantes ^(30, 31, 37, 40, 56–58, 113), onde o nível de alteração em tais exames denota alterações orgânicas já importantes no metabolismo do indivíduo. Porém, na análise multivariada, somente o fator V e a lipase se mostraram variáveis independentes e estatisticamente significativas para risco de óbito. Os pontos de corte sugeridos (lipase maior que 147,5 U/L e fator V menor que 56,5%) parecem determinantes para identificar antecipadamente os casos com potencial gravidade com possibilidade de talvez janela terapêutica para intervenções.

Embora os resultados de fatores laboratoriais preditores de óbito sejam semelhantes com outros relatos, a medida de lipase e fator V parece ser exclusiva de nossa casuística. A análise destes dois marcadores não foi feita nos demais estudos pois provavelmente os demais centros não dispõem de fácil acesso a esses exames, rotineiramente, visto custo considerável para sua execução.

5.3 Envolvimento pancreático e dosagem de lipase

A pancreatite é inflamação do tecido pancreático e pode ser diagnosticada na presença de dor abdominal, aumento das enzimas

pancreáticas e por alterações radiológicas típicas em exames radiológicos abdominais ⁽¹¹⁶⁾. Quando há acometimento pancreático junto com a resposta inflamatória exacerbada e disfunções orgânicas, a mortalidade da pancreatite por si só já aumenta exponencialmente, mesmo em causas clássicas não infecciosas ⁽¹¹⁷⁾. Tais alterações contribuem para o choque em retroalimentação positiva da piora desta inflamação sistêmica conjuntamente com a falência de múltiplos órgãos e sistemas ^(118, 119).

A inflamação pancreática nos casos graves de FA internados em unidade de terapia intensiva foi confirmada pelas alterações laboratoriais, radiológicas e histopatológicas. Dentre as causas infecciosas de pancreatite, a etiologia viral já foi relatada inclusive por outros flavivírus como Dengue ⁽¹²⁰⁾, West Nile ⁽¹²¹⁾ e Rocio ⁽¹²²⁾. Um caso fatal de FA com envolvimento pancreático foi descrito em um paciente chinês que adquiriu esta infecção em Angola ⁽³²⁾. Neste relato, há a descrição de alterações pancreáticas na autópsia e de aumento da lipase na evolução clínica e laboratorial. Já nas autópsias realizadas em pacientes pós transplante hepático por FA, foram evidenciados edema do parênquima, hemorragias e esteatonecrose da gordura peripancreática. Na microscopia, houve a presença de pancreatite isquêmica e de reperfusão, associado com dano endotelial difuso e detecção de antígeno de FA por imunohistoquímica, mas não se percebeu infiltrado inflamatório no parênquima e nem sinais de vasculite. Nessa amostra, a detecção de RNA de VFA no tecido pancreático foi possível em 2 pacientes ⁽²⁹⁾, embora o achado de pancreatite não tenha sido descrita na infecção pelo VFA experimental em roedores ⁽¹²³⁾.

Há duas explicações para o envolvimento pancreático na FA grave: consequência direta do choque hemorrágico com hipoperfusão do parênquima pancreático ou até mesmo a ação viral direta do VFA neste órgão. A escassez de relatos de pancreatite como evento relevante na FA grave pode ser consequência da maior restrição de recursos diagnósticos nos surtos anteriores de FA. No entanto, nosso achado da lipase como variável independente associada ao óbito reforça a importância da pancreatite na

fisiopatogenia das formas graves, contribuindo para a deterioração e instabilidade clínica.

5.4 Insuficiência hepática aguda, coagulopatia e fator V

A definição de insuficiência hepática aguda ⁽¹²⁴⁾ é uma elevação de duas a três vezes acima do limite superior da normalidade das aminotransferases como um marcador de lesão hepática, associada à função hepática prejudicada, ou seja, icterícia e coagulopatia, em um paciente sem doença hepática crônica prévia. Esta descrição clínica originou-se de observações de hepatotoxicidade relacionada a medicamentos, mas é aplicável a outras apresentações de outras etiologias.

Em 1969, Dennis *et al.* já haviam estudado a FA em macacos onde descreveu a FA como "doença febril que se apresenta de forma moderada à fulminante, com insuficiência hepática, albuminúria, manifestações hemorrágicas, coma e óbito" ⁽¹²⁵⁾ e a presença de sangramentos foi visualizada na luz de órgãos do trato gastrointestinal. Nos exames de coagulação, percebeu-se uma tendência à plaquetopenia com o passar dos dias após a inoculação e o alargamento de tempos de coagulação das vias intrínseca e extrínseca.

A FA é uma doença hemorrágica e a *causa mortis* principal costuma ser o choque hemorrágico, onde a produção de fatores de coagulação prejudicada pela lesão hepática ocorre conjuntamente com o consumo de fatores de coagulação pela disfunção de múltiplos órgãos e sistemas. Embora seja o modelo de estudo de febres hemorrágicas virais, pouco se sabe sobre quais vias da coagulação estariam prejudicadas nesta doença. Um modelo *in vivo* em cobaias com hepatócitos e posteriormente infectadas com o VFA mostrou que altos valores de D-dímero, produto da degradação da fibrina demonstraria ativação de coagulação intravascular disseminada (CIVD), fato também visto na febre hemorrágica causada pelo vírus Ebola ⁽¹²⁵⁾. A coagulopatia também poderia sofrer retroalimentação positiva do estado

hiper-inflamatório, onde a infecção de células de Kupffer e de células endoteliais poderia contribuir para o consumo de fatores de hemostasia. A presença da coagulopatia antes da necrose maciça do parênquima hepático demonstra que tal alteração seria não só da diminuição de produção de fatores, mas também do consumo acelerado visto o aumento exacerbado de produtos de degradação do fibrinogênio com a fibrinólise ativa e contínua.

O fator V também é conhecido como proacelerina ou fator lábil e foi descrito por Paul Owen em 1947 ⁽¹²⁶⁾. Consiste em uma glicoproteína que faz parte da cascata de coagulação, sintetizada pelo parênquima hepático e pelos megacariócitos. É uma proteína de alto peso molecular que circula no sangue sob a forma de pró-fator para o fator V ativado, que ligará ao fator X ativado, promovendo a ativação de protrombina para trombina, que por sua vez, converte o fibrinogênio em fibrina ⁽¹²⁷⁾.

Baixos níveis de fator V em casos de falência hepática aguda são utilizados como indicadores de necessidade de transplante hepático e estão relacionados ao prognóstico de hepatites fulminantes ^(128, 129). Possui forte relação com falência hepática aguda, onde a dosagem do fator V cai rapidamente e valores abaixo de 20% apresentam boa correlação com sobrevida de pacientes com insuficiência hepática aguda por paracetamol ou outras causas de falência hepática aguda.

Outras patologias infecciosas que também são diagnósticos diferenciais de FA como leptospirose, infecção pelos vírus Ebola ⁽¹³⁰⁾, dengue ⁽¹³¹⁾, hepatite pelo vírus delta ⁽¹³²⁾ e febre maculosa brasileira ⁽¹³³⁾ também apresentam no seu espectro manifestações hemorrágicas. Tais manifestações podem ser provocadas pela inflamação excessiva que contribui para a coagulopatia de consumo, explicada pelos altos valores de D-dímero e baixos valores de fatores de coagulação, muitas vezes também evoluindo para CIVD.

Ainda que os níveis baixos de fator V possam ser explicados pela necrose maciça do parênquima hepático, a FA parece ter uma via peculiar de coagulopatia, visto que somente isso não seria suficiente para explicar as

discrasias hemorrágicas observadas. O consumo do fator V na FA grave vista pela queda acentuada e abrupta mostra que o consumo de fatores de coagulação e sua não reposição pelo fígado lesado tem implicações importantes para a homeostase da coagulação sanguínea. A insuficiência hepática aguda na FA, manifestada pela coagulopatia, culmina no choque hemorrágico e pode ser antecipada pela avaliação do fator V, com alta probabilidade de óbito quando o fator V atinge níveis abaixo de 56%.

A coagulopatia também foi percebida por Romero e Trejos na descrição dos 157 casos de FA na epidemia do Panamá e Costa Rica, quando descreveram hematêmese e melena em 41 casos dos 43 que foram a óbito ⁽¹³⁴⁾. A icterícia também não foi percebida inicialmente. Soluços, convulsões e oligúria, proteinúria e aumento de ureia também foram descritos nos casos que evoluíram de forma fatal. A análise da urina, ureia sanguínea, o hemograma e especialmente a porcentagem de protrombina foram fatores prognósticos para mortalidade ⁽¹³⁵⁾.

Em 1973, Borges *et al.* ⁽¹³⁶⁾ publicaram uma coorte de 6 casos atendidos com FA em Goiânia-GO, onde as manifestações hemorrágicas, principalmente digestivas, apareceram muito antes da icterícia e de outros sinais de comprometimento hepático. Essa observação levou os autores a hipotetizar que a coagulopatia fosse por consumo de fatores como descrito por Dennis *et al.* em 1969 em estudos *in vivo*. Ressalta-se que nesta mesma casuística, foi observado também o comprometimento renal considerável. Na fase hemorrágica, os achados mais relevantes de acordo com a tecnologia disponível na época foram a plaquetopenia, retração deficiente do coágulo, hipoprotrombinemia, hipofibrinogenemia acentuada além de deficiência de fatores V, VIII e IX.

5.5 Dano hepático e a relação AST/ALT

As aminotransferases hepáticas encontram-se armazenadas no citosol de hepatócitos e em menores quantidades em outros órgãos, como baço, rins, coração, sistema nervoso central, pâncreas e músculos ⁽¹³⁷⁾. O aumento das aminotransferases dosadas no soro é decorrente de lesões hepáticas que causem perda da integridade da membrana plasmática dos hepatócitos, com evolução ou não para necrose posterior ⁽¹³⁸⁾. As causas para a elevação das aminotransferases podem ser desde isquemia hepática, toxicidade medicamentosa a agentes hepatotrópicos diretos, como as hepatites virais sendo estas últimas responsáveis por elevações mais exacerbadas ⁽¹³⁸⁾.

Antes do avanço dos métodos sorológicos e moleculares para o diagnóstico preciso de hepatites agudas, em 1957, De Ritis e colaboradores ⁽¹³⁹⁾ tentaram estimar a etiologia e prognóstico clínico de casos com lesões hepáticas através da razão de AST/ALT. De maneira geral, nos casos com ALT menor que AST, a hepatite aguda de etiologia alcoólica seria mais plausível. Já quando os níveis de ALT eram maiores que os de AST, a etiologia provável poderia ser hepatite aguda viral e quando houvesse tendência a inversão desta relação, deveria se manter vigilância pelo risco de insuficiência hepática aguda fulminante, principalmente se $AST/ALT > 2,0$. Dados sugerem que se a ALT se encontra entre 200 e 500 U/L e a relação AST/ALT é acima de 1,5 há 40 vezes mais chance de aumentos de ALT para níveis acima de 1.000 U/L em poucos dias. Ainda sobre o prognóstico da relação, o intervalo de confiança de 95% para evolução para óbito é com a relação AST/ALT entre 1,2 e 2,3 enquanto para sobreviver é de 0,2 a 0,6 ⁽¹⁴⁰⁾. A relação AST/ALT é utilizada em diversos cenários como fator prognóstico para hepatopatias em geral e até mesmo para avaliar o prognóstico de pacientes com COVID-19 grave ^(141, 142).

Na análise univariada, a relação AST/ALT não resultou como variável independentemente relacionada ao óbito ($p = 0,058$), entretanto, a tendência

à significância estatística é plausível pela observação clínica e demonstrada por outros estudos semelhantes. O aumento de AST está relacionado ao envolvimento generalizado de diferentes órgãos (baço, coração, rins, intestinos e pâncreas) além dos danos importantes no tecido hepático. A dosagem de aminotransferases também apresentou relação com desfecho fatal na FA grave nos trabalhos de Kallas *et al.* ⁽⁵⁶⁾, Ribeiro *et al.* ⁽⁵⁸⁾ e Escosteguy *et al.* ⁽⁵⁷⁾. Tal relação é explicada pelo envolvimento sistêmico generalizado nos casos de FA grave, onde razões AST/ALT mais altas talvez possam predizer casos mais graves e maior risco de óbito.

5.6 Carga viral do VFA

Quando avaliada nos primeiros cinco dias de sintomas referidos comparada com a dosagem em pacientes após o 5º dia, a carga viral apresentou significância estatística nestes dois grupos. Contudo, quando avaliadas as médias de carga viral do VFA e os desfechos sobrevida ou óbito, não foi possível evidenciar uma associação. Essas duas afirmações expressam que a história natural da doença e a resposta do hospedeiro produzem uma queda esperada e gradual da viremia, mas a partir de certo ponto, a reação imune provocada pela infecção não seria mais dependente diretamente da quantidade de partículas virais existentes naquele momento.

A resposta imune desencadeada pela infecção viral é necessária para contenção da viremia, mas também seria desencadeante para a tempestade de citocinas e inflamação descontrolada com prejuízo para o hospedeiro. Esta inflamação se comportaria com retroalimentação positiva de quanto maior a inflamação, maior a lesão hepática, mais acentuada evolui coagulopatia, causando mais disfunções orgânicas e maior gravidade, em uma espiral descendente de cascata inflamatória. Embora divergente da publicação de Kallas *et al.* ⁽⁵⁶⁾, a casuística de ambas as coortes foi diferente na gravidade dos casos, com a inclusão de pacientes de diferentes perfis clínicos, inclusive casos de enfermidade com menor gravidade.

5.7 Reservatórios virais possíveis, detecção prolongada em sangue e urina

A detecção de material genético viral por períodos prolongados em sangue e urina, bem como o potencial de reservatórios virais para recorrência de inflamação hepática é registrada em descrições prévias ^(96, 143, 144), e também já existem publicadas observações semelhantes deste fenômeno, inclusive no período epidêmico recente ^(93–95, 97, 110, 145).

Alguns flavivírus são identificados no tecido renal e na urina em modelos animais e em doença em humanos, inclusive alguns associados com doença renal ^(146, 147). A presença de RNA de VFA em tecido renal é descrita por De Brito em 1992 ⁽¹⁴⁸⁾ e confirmado posteriormente em 2018 ⁽²⁹⁾ com imunohistoquímica positiva nos túbulos renais e RT-qPCR com detecção de RNA do VFA no parênquima renal. A proteinúria também é um marcador de gravidade desde estudos antigos, mas o mecanismo exato de lesão renal ainda precisa ser esclarecido.

A lesão renal aguda avaliada pelo índice CKD-EPI tem importância para a evolução grave e foi significativa na análise univariada. O dano renal na FA é descrito tanto por estudos mais antigos que relacionam a presença de proteinúria com pior evolução ⁽¹⁴⁹⁾ como também em estudos mais recentes ^(113, 146, 150). Os mecanismos exatos de lesão renal na FA ainda não foram totalmente esclarecidos, mas acredita-se que a lesão renal aguda evidenciada pelo aumento de creatinina, oligúria, acidose, uremia e necessidade de terapia de substituição renal possa ser deflagrada pela inflamação desenfreada e outras disfunções orgânicas – falência hepática aguda, choque hemorrágico e toxicidade induzida por depósitos de bilirrubinas no parênquima renal.

A presença de material genético viral em urina é utilizada também para diagnóstico etiológico ^(65, 151), mas a detecção persistente do material genético viral em amostras de urina de alguns pacientes por até 47 dias após o início da doença sugere que o vírus possa persistir no parênquima renal por mais tempo após a fase aguda da doença. Esses resultados estão de acordo

com o relato de caso mostrando detecção viral persistente na urina e sêmen 21 dias após episódio de FA ⁽⁶⁴⁾ e a presença de RNA viral nos rins e testículos ^(29, 110) reforça a ideia de possíveis reservatórios no trato urogenital. Os reservatórios poderiam ser fonte de novos vírions que infectaram os novos enxertos em caso de transplante hepático e até de ativação imune posterior à fase aguda inicial. Outros órgãos também poderiam servir de reservatório, como baço, medula óssea, o próprio fígado e células do sistema imune/retículo-endotelial.

A FA deve ser entendida não como uma doença exclusiva do fígado, mas como uma doença sistêmica que afeta diversos órgãos e sistemas ^(73, 110) por tempo prolongado além da fase aguda descrita inicialmente. Isto pode ser percebido pelas alterações laboratoriais indicativas de comprometimento sistêmico nos casos graves de FA internados em UTI. O aumento de CPK, DHL, leucopenia e outros marcadores como lipase, amilase, creatinina, leucopenia e queda dos fatores de coagulação, sistema nervoso, oftalmopatias são indicativos de tal comprometimento sistêmico, embora ainda permaneça em investigação se são decorrentes de ação direta viral ou se fazem parte da resposta imune à infecção viral. No caso dos pacientes submetidos a transplante hepático, o fato do enxerto ser infectado novamente pelo VFA mostra que embora seja o órgão mais profundamente acometido, também não é o único. Em teoria, retirado o órgão em falência e substituído por outro são, haveria a plausibilidade biológica para resolução ou abrandamento da doença se fosse restrita somente ao tecido hepático ⁽⁴⁸⁻⁵⁰⁾.

5.8 Hepatite tardia associada à FA (HT-FA)

A hepatite tardia associada à FA é uma manifestação recidivante de inflamação do parênquima hepático vista pelo aumento subsequente de aminotransferases posterior à fase aguda da doença, percebida entre 1 e 4 meses após os sintomas iniciais de FA. Os pacientes podem ter aumento das aminotransferases sem sintomas ou apresentar sintomas inespecíficos, como dor abdominal superior, mal-estar e fraqueza. Em alguns pacientes observou-se também um aumento das bilirrubinas totais e icterícia clínica. Em nossa amostra, o curso clínico foi benigno com recuperação clínica completa.

Há poucas descrições deste fenômeno na literatura científica e ele não é ressaltado nas publicações utilizadas como referência. Durante epidemia de FA ocorrida na Nigéria década de 70, os casos atendidos em um serviço de referência foram submetidos à biópsia hepática durante a fase aguda e na convalescença, visto que o diagnóstico etiológico de FA muitas vezes só era acessível através de estudo histopatológico ⁽¹⁴⁴⁾.

Em publicações mais atuais, consta o relato de dois turistas franceses que adquiriram FA no Brasil em 2018 que posteriormente desenvolveram um novo aumento de aminotransferases, mas nesses 2 casos não foram realizadas biópsias hepáticas ⁽⁹⁷⁾. Ainda deste período também há relatos de casos com achados semelhantes clínicos e histopatológicos semelhantes aos nossos e também de evolução aparentemente sem sequelas ^(93–95).

As alterações laboratoriais percebidas são majoritariamente aumento de aminotransferases, mas alguns casos também houve aumento de bilirrubinas. Em todos eles, a evolução foi benigna com recuperação laboratorial e clínica dos casos, mas não sabemos ainda se haveria potencial para fibrose hepática futura e os casos devem ser acompanhados e avaliados sobre necessidade de nova biópsia hepática futura. Recentemente, dois estudos com a mesma população foram realizados em nossa instituição para avaliar possíveis alterações ultrassonográficas e/ou em elastografia hepática nos pacientes sobreviventes de FA grave. Embora seja uma amostra reduzida

de participantes, o acompanhamento não observou indícios de fibrose hepática até o momento após FA grave ^(152, 153).

Nas biópsias hepáticas dos pacientes com HT-FA realizadas e descritas neste estudo, foram achados no tecido hepático de necroinflamação, apoptose, necrose focal e degeneração hidrópica dos hepatócitos em todas as zonas lobulares, sem predominância típica de FA nas zonas médias. Embora não seja patognomônica da FA, a lesão hepática típica da FA aguda é a necrose mediozonal em zona 2 dos lóbulos hepáticos, também relatada em outras febres hemorrágicas virais como a dengue ⁽¹⁵⁴⁾. A preferência por este tipo de lesão específica é atribuída ao hipofluxo hepático durante o choque, mas também à possibilidade de tropismo viral com ação viral direta ou até danos imunomediados ^(155, 156). Outros aspectos foram também áreas de necrose confluyente e hipertrofia de células de Kupffer.

Na análise imunohistoquímica, o antígeno de VFA no citoplasma de macrófagos apresentou maior densidade quando comparado à presença de antígeno de VFA nos hepatócitos. Na FA aguda, a relação da localização de tais densidades é inversa, com maior intensidade antigênica no citoplasma de hepatócitos e em menor quantidade no interior de macrófagos e outras células imunes que se encontram no tecido hepático. Desta forma, a presença do estímulo viral em células imunes e o RNA de VFA detectável por RT-qPCR nas biópsias hepáticas poderiam ser responsáveis por iniciar uma nova inflamação imunomediada pela presença de partículas virais.

Ainda na resposta imune hepática após agressões virais agudas, as células de Kupffer são os agentes responsáveis pela eliminação de figuras estranhas ao microambiente hepático e a restauração da homeostase local. Estas células são divididas em perfis denominados M1 e M2, embora hoje já haja a descrição dessa divisão até M17, de acordo com a resposta imune que a célula executa naquele momento e a produção de citocinas de acordo com tais perfis.

A polarização M1 versus M2, em um ambiente com suas respectivas citocinas pró-inflamatórias (padrão Th1 - interleucina 1-beta, TNF alfa e

interleucina 6) versus anti-inflamatórias (padrão Th2 - interleucina 10 e TGF beta) são necessárias para o controle da infecção viral na fase aguda, com gradativa transição para M2, responsável pela reparação tecidual e redução da inflamação, diminuição da lesão hepática e cicatrização local. O reparo tecidual depende da transição do padrão de resposta imune de M1 para M2. Esse mesmo fenômeno é visto na infecção pelo vírus da hepatite C ⁽¹⁵⁷⁾, também pertencente à família *Flaviviridae*.

Na HT-FA ainda não está claro para nós se a transição M1 para M2 é prejudicada ou se há um retorno para o perfil M1, nem quais seriam os gatilhos para que isso ocorresse e se os possíveis reservatórios teriam importância para esse desencadear fenômeno. Fatores imunológicos, genéticos, epigenéticos (como microRNAs) e infecciosos poderiam alterar esse processo, impedindo a transição de M1 para M2 ou desbalanceando o curso natural de remissão da doença. Também ainda necessitam de clarificação o se o genótipo viral ou mutações genéticas virais poderiam determinar o aparecimento da HT-FA, qual o papel de possíveis anticorpos prévios contra outros flavivírus sindêmicos com a FA no Brasil, como dengue e Zika ⁽¹⁵⁸⁾ e até onde os fatores genéticos dos hospedeiros podem interferir.

Em 6 dos 26 casos de HT-FA, foi utilizado prednisona na dose de 40 mg por dia. Apesar do aparente curso benigno do HT-FA, a prescrição do tratamento com corticosteroides em pacientes com aminotransferases e níveis de bilirrubina muito elevados ou persistentemente elevados foi feita conjuntamente com discussões multidisciplinares com especialistas na área. Tendo em vista o aspecto inédito na prática clínica e escassas publicações prévias sobre o assunto, o objetivo do uso de corticosteroides no cenário de uma nova agressão inflamatória foi preservar o fígado de fibrose e possíveis lesões sequelares. Embora a comparação dos grupos que fizeram uso ou não de prednisona não tenha significância estatística, não percebemos alterações decorrentes de eventos adversos do uso de corticosteroides na dose utilizada.

Os corticosteroides são amplamente conhecidos e utilizados para diversos cenários de inflamação exacerbada de várias causas, desde

patologias autoimunes até algumas infecciosas. Agem como moduladores de tal fenômeno, onde há um descontrole dessa resposta ocasionando danos locais e sistêmicos. No cenário de doenças hepáticas agudas, são utilizados majoritariamente para o acometimento autoimune, mas também há o uso para insuficiência hepática aguda de origem infecciosa como a hepatite B aguda. O uso de corticosteroides para inflamação hepática aguda, visa a reversibilidade de degeneração de hepatócitos e impedir a necrose irreversível, a citólise de hepatócitos balonizados e outros mecanismos de apoptose celular. O aumento de aminotransferases no contexto representa a reação inflamatória com dano hepatocelular importante e a ação dos corticosteroides age modulando a resposta imune ^(159, 160).

Apesar de ser uma doença conhecida há séculos e prevenível por vacina, a FA ainda surpreende com novos aspectos e descobertas acerca de sua fisiopatogenia. Este trabalho visa também mostrar que o conhecimento acerca de uma determinada patologia é dinâmico e mutável. À medida que o conhecimento avança no tema, novos aspectos são descritos e novas janelas para oportunidades terapêuticas podem ser experimentadas.

6. CONCLUSÕES

6. CONCLUSÕES

6.1 Fatores prognósticos para evolução grave na febre amarela

- A FA é uma doença de evolução rápida e com alto potencial de letalidade em pacientes com necessidade de suporte intensivo e alterações laboratoriais compatíveis com disfunções orgânicas.
- Em contraposição à descrição clássica na doença, a icterícia não foi frequente nos dias iniciais e não evidenciamos a descrição de evolução trifásica.
- A dosagem de fator V e de lipase pode antecipar o prognóstico destes casos e auxiliar na escolha de intervenções terapêuticas.
- O acometimento pancreático nos casos graves, mensurado pelos altos níveis de lipase, e a coagulopatia refletida nos baixos valores de fator V são variáveis independentes relacionadas com a evolução para óbito.
- Este foi o primeiro trabalho que relacionou a quantificação de carga viral do VFA com o desfecho para óbito nesta população. A média de cargas virais de VFA nos casos graves não apresentou relação com o desfecho para óbito na população de pacientes com necessidade de suporte intensivo.
- O RNA viral é detectável por tempo maior que o descrito previamente em sangue e urina, mesmo após a recuperação clínica. A viremia e a virúria prolongadas ainda necessitam de melhor avaliação quanto à sua interferência na fisiopatologia da doença e à possibilidade de reservatórios virais em outros locais além do fígado.

6.2 Hepatite tardia associada à febre amarela

- A HT-FA é um aspecto pouco documentado na fisiopatogenia da FA. É definida por um novo aumento de aminotransferases posteriormente à recuperação da FA inicial com subsequente recuperação hepática.
- A presença de antígenos virais em células macrofágicas hepáticas reforça a hipótese de lesão hepática imunomediada desencadeada pela presença de partículas virais residuais.
- Embora de aparente evolução benigna, os casos de HT-FA devem manter acompanhamento direcionado para rastreio e prevenção de possíveis sequelas hepáticas.

7.REFERÊNCIAS

7. REFERÊNCIAS

1. Waggoner JJ, Rojas A, Pinsky BA. Yellow fever virus: diagnostics for a persistent arboviral threat. *J Clin Microbiol.* 2018 Sep 25;56(10).
2. Monath TP. Yellow fever: an update. *Lancet Infect Dis.* 2001 Aug;1(1):11–20.
3. Wilder-Smith A. Yellow fever in travelers. *Curr Infect Dis Rep.* 2019 Oct 31;21(11):42.
4. Giancetti E, Cianchi V, Torelli A, Montomoli E. Yellow fever: origin, epidemiology, preventive strategies and future prospects. *Vaccines (Basel).* 2022 Feb 27;10(3).
5. Bryant JE, Holmes EC, Barrett ADT. Out of Africa: a molecular perspective on the introduction of yellow fever virus into the Americas. *PLoS Pathog.* 2007 May 18;3(5):e75.
6. Vasconcelos PFC, Bryant JE, da Rosa TPA, Tesh RB, Rodrigues SG, Barrett ADT. Genetic divergence and dispersal of yellow fever virus, Brazil. *Emerging Infect Dis.* 2004 Sep;10(9):1578–84.
7. 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;
8. Staples JE, Monath TP. Yellow fever: 100 years of discovery. *JAMA.* 2008 Aug 27;300(8):960–2.

9. Reed W. Recent Researches concerning the Etiology, Propagation, and Prevention of Yellow Fever, by the United States Army Commission. *J Hyg (Lond)*. 1902 Apr 1;2(2):101–19.
10. Mettenleiter TC. The first “virus hunters”. *Adv Virus Res*. 2017 Sep 9;99:1–16.
11. Simmonds P, Becher P, Bukh J, Gould EA, Meyers G, Monath T, *et al.*. ICTV virus taxonomy profile: flaviviridae. *J Gen Virol*. 2017 Jan;98(1):2–3.
12. Gardner CL, Ryman KD. Yellow fever: a reemerging threat. *Clin Lab Med*. 2010 Mar;30(1):237–60.
13. Beasley DWC, McAuley AJ, Bente DA. Yellow fever virus: genetic and phenotypic diversity and implications for detection, prevention and therapy. *Antiviral Res*. 2015 Mar;115:48–70.
14. Monath TP, Vasconcelos PFC. Yellow fever. *J Clin Virol*. 2015 Mar;64:160–73.
15. International Committee on Taxonomy of Viruses. International Committee on Taxonomy of Viruses - ICTV [Internet]. [cited 2020 Nov 7]. Available from:

https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_online_report/positive-sense-rna-viruses/w/flaviviridae/360/genus-flavivirus
16. 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*. 1985 Aug 23;229(4715):726–33.

17. Faria NR, Kraemer MUG, Hill SC, Goes de Jesus J, Aguiar RS, Iani FCM, *et al.* Genomic and epidemiological monitoring of yellow fever virus transmission potential. *Science*. 2018 Aug 31;361(6405):894–9.
18. Cunha MS, da Costa AC, de Azevedo Fernandes NCC, Guerra JM, Dos Santos FCP, Nogueira JS, *et al.* Epizootics due to Yellow Fever Virus in São Paulo State, Brazil: viral dissemination to new areas (2016-2017). *Sci Rep*. 2019 Apr 2;9(1):5474.
19. Barrett ADT, Higgs S. Yellow fever: a disease that has yet to be conquered. *Annu Rev Entomol*. 2007; 52:209–29.
20. Wilder-Smith A, Monath TP. Responding to the threat of urban yellow fever outbreaks. *Lancet Infect Dis*. 2017;17(3):248–50.
21. Center for Disease Control and Prevention. CDC yellow book 2020: health information for international travel. Brunette GW, Nemhauser JB, editors. Oxford University Press; 2019.
22. Johansson MA, Vasconcelos PFC, Staples JE. The whole iceberg: estimating the incidence of yellow fever virus infection from the number of severe cases. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2014 Aug;108(8):482–7.
23. World Health Organization. Managing Yellow fever epidemics. Geneva: World Health Organization; 2019 Nov p. 24.
24. Quaresma JAS, Barros VLRS, Pagliari C, Fernandes ER, Andrade HF, Vasconcelos PFC, *et al.* Hepatocyte lesions and cellular immune response in yellow fever infection. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Feb;101(2):161–8.
25. Monath TP, Barrett ADT. Pathogenesis and pathophysiology of yellow fever. Elsevier; 2003. p. 343–95.

-
26. Jentes ES, Pomeroy G, Gershman MD, Hill DR, Lemarchand J, Lewis RF, *et al.* The revised global yellow fever risk map and recommendations for vaccination, 2010: consensus of the Informal WHO Working Group on Geographic Risk for Yellow Fever. *Lancet Infect Dis.* 2011 Aug;11(8):622–32.
27. Forbes A. “A Little Seasoning Would Aid in the Digestion of Our Factums”: Wit, Evidence, and the Evolving Form of Medical Debate in New Orleans, 1853-1868. *Bull Hist Med.* 2017;91(3):524–52.
28. Basler CF. Molecular pathogenesis of viral hemorrhagic fever. *Semin Immunopathol.* 2017 Jul;39(5):551–61.
29. Duarte-Neto AN, Cunha MDP, Marcilio I, Song ATW, de Martino RB, Ho Y-L, *et al.* Yellow fever and orthotopic liver transplantation: new insights from the autopsy room for an old but re-emerging disease. *Histopathology.* 2019 Nov;75(5):638–48.
30. Ho Y-L, Joelsons D, Leite GFC, Malbouisson LMS, Song ATW, Perondi B, *et al.* Severe yellow fever in Brazil: clinical characteristics and management. *J Travel Med.* 2019 Jun 11;26(5).
31. Kallas EG, Wilder-Smith A. Managing severe yellow fever in the intensive care: lessons learnt from Brazil. *J Travel Med.* 2019 Jun 11;26(5).
32. Chen Z, Liu L, Lv Y, Zhang W, Li J, Zhang Y, *et al.* A fatal yellow fever virus infection in China: description and lessons. *Emerg Microbes Infect.* 2016 Jul 13;5(7): e69.
33. Sekhawat V, Lucas SB. Re-emergent yellow fever: new faces of an old killer. *Histopathology.* 2019;75(5):636–7.

34. 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*. 2013 Sep;23(5):305–18.
35. Vieira WT, Gayotto LC, de Lima CP, de Brito T. Histopathology of the human liver in yellow fever with special emphasis on the diagnostic role of the Councilman body. *Histopathology*. 1983 Mar;7(2):195–208.
36. Alves VAF. Acute viral hepatitis: beyond A, B, and C. *Surg Pathol Clin*. 2018 Jun;11(2):251–66.
37. Kleinert RDV, Montoya-Diaz E, Khera T, Welsch K, Tegtmeyer B, Hoehl S, *et al*. Yellow Fever: Integrating Current Knowledge with Technological Innovations to Identify Strategies for Controlling a Re-Emerging Virus. *Viruses*. 2019 Oct 17;11(10).
38. Chen LH, Wilson ME. Yellow fever control: current epidemiology and vaccination strategies. *Trop Dis Travel Med Vaccines*. 2020 Jan 10; 6:1.
39. Klitting R, Roth L, Rey FA, de Lamballerie X. Molecular determinants of Yellow Fever Virus pathogenicity in Syrian Golden Hamsters: one mutation away from virulence. *Emerg Microbes Infect*. 2018 Mar 29;7(1):51.
40. de Ávila RE, José Fernandes H, Barbosa GM, Araújo AL, Gomes TCC, Barros TG, *et al*. Clinical profiles and factors associated with mortality in adults with yellow fever admitted to an intensive care unit in Minas Gerais, Brazil. *Int J Infect Dis*. 2020 Apr; 93:90–7.
41. Silva NIO, Sacchetto L, de Rezende IM, Trindade G de S, LaBeaud AD, de Thoisy B, *et al*. Recent sylvatic yellow fever virus transmission in Brazil: the news from an old disease. *Virol J*. 2020 Jan 23;17(1):9.

-
42. Cunha MDP, Duarte-Neto AN, Pour SZ, Ortiz-Baez AS, Černý J, Pereira BB de S, *et al.* Origin of the São Paulo Yellow Fever epidemic of 2017-2018 revealed through molecular epidemiological analysis of fatal cases. *Sci Rep.* 2019 Dec 31;9(1):20418.
43. Bacha HA, Johanson GH. Yellow fever. *Rev Assoc Med Bras.* 2017;63(4):291–2.
44. Bifani AM, Ong EZ, de Alwis R. Vaccination and therapeutics: responding to the changing epidemiology of yellow fever. *Curr Treat Options Infect Dis.* 2020 Jul 10;1–12.
45. Wilder-Smith A, Chen LH, Melo A, Visser LG. Improving clinical management of patients with severe yellow fever. *Lancet Infect Dis.* 2019 May 16;19(7):678–9.
46. Monath TP. Treatment of yellow fever. *Antiviral Res.* 2008 Apr;78(1):116–24.
47. Song ATW, Clemente WT. Yellow fever in transplantation. *Curr Infect Dis Rep.* 2021 Nov;23(11):18.
48. De Faria Andrade AM, Castro RFM, Lisboa QC, Vidigal PVT, Castro RG, Garcia SLM, *et al.* Acute liver failure due to yellow fever during Brazil's outbreak: From initial management to liver transplantation. *Hepatology.* 2018;68(1):1471A-1472A.
49. Vieira V, Pacheco L, Demetrio L, Balbi E, Bellinha T, Toledo R, *et al.* Liver transplantation for acute liver failure due to yellow fever: A case report. *Transplant Proc.* 2019 Jun;51(5):1625–8.

50. Song ATW, Carneiro D'Albuquerque LA. Acute liver failure secondary to yellow fever: A challenging scenario. *Clin Liver Dis (Hoboken)*. 2019 Feb;13(2):58–61.
51. Mendes ÉA, Pilger DRB de, Santos Natri AC de S, Malta F de M, Pascoalino BDS, Carneiro D'Albuquerque LA, *et al.* Sofosbuvir inhibits yellow fever virus in vitro and in patients with acute liver failure. *Ann Hepatol*. 2019 Sep 25;18(6):816–24.
52. de Freitas CS, Higa LM, Sacramento CQ, Ferreira AC, Reis PA, Delvecchio R, *et al.* Yellow fever virus is susceptible to sofosbuvir both in vitro and in vivo. *PLoS Negl Trop Dis*. 2019 Jan 30;13(1): e0007072.
53. Souza YRM de, Manso PP de A, Oliveira BCD de, Terra MABL, Paschoal T, Caminha G, *et al.* Generation of Yellow Fever virus vaccine in skeletal muscle cells of chicken embryos. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2019 Dec 9;114:e190187.
54. Reno E, Quan NG, Franco-Paredes C, Chastain DB, Chauhan L, Rodriguez-Morales AJ, *et al.* Prevention of yellow fever in travellers: an update. *Lancet Infect Dis*. 2020 May 7;20(6): e129–37.
55. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Coordenação-Geral do Programa Nacional de Imunizações. Manual dos centros de referência para imunobiológicos especiais - Handbook of the Reference Centers for Special Immunobiologicals. 5th ed. Brasília: Ministério da Saúde; 2019.
56. Kallas EG, D'Elia Zanella LGFAB, Moreira CHV, Buccheri R, Diniz GBF, Castiñeiras ACP, *et al.* Predictors of mortality in patients with yellow fever: an observational cohort study. *Lancet Infect Dis*. 2019 May 16;19(7):750–8.

-
57. Escosteguy CC, Pereira AGL, Marques MRVE, Lima TR de A, Galliez RM, Medronho R de A. Yellow fever: profile of cases and factors associated with death in a hospital in the State of Rio de Janeiro, 2017-2018. *Rev Saude Publica*. 2019 Oct 21; 53:89.
58. Ribeiro AF, Cavalin RF, Abdul Hamid Suleiman JM, Alves da Costa J, Januaria de Vasconcelos M, Sant'Ana Málaque CM, *et al*. Yellow Fever: Factors Associated with Death in a Hospital of Reference in Infectious Diseases, São Paulo, Brazil, 2018. *Am J Trop Med Hyg*. 2019;101(1):180–8.
59. 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*. 2007 Feb;101(2):169–75.
60. Yellow fever surveillance and outbreak response: revision of case definitions, October 2010. *Wkly Epidemiol Rec*. 2010 Nov 19;85(47):465–72.
61. Simon LV, Hashmi MF, Torp KD. Yellow Fever. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.
62. Pan American Health Organization. Laboratory Diagnosis of Yellow Fever Virus infection. World Health Organization; 2018 Jul.
63. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Febre amarela: guia para profissionais de saúde. Brasília: Ministério da Saúde, Secretaria de Atenção à Saúde; 2017.
64. Barbosa CM, Di Paola N, Cunha MP, Rodrigues-Jesus MJ, Araujo DB, Silveira VB, *et al*. Yellow fever virus RNA in urine and semen of convalescent patient, Brazil. *Emerging Infect Dis*. 2018 Jan 17;24(1).
65. Reusken CBEM, Knoester M, GeurtsvanKessel C, Koopmans M, Knapen DG, Bierman WFW, *et al*. Urine as sample type for molecular diagnosis of

natural yellow fever virus infections. *J Clin Microbiol.* 2017 Aug 30;55(11):3294–6.

66. Lilay A, Asamene N, Bekele A, Mengesha M, Wendabeku M, Tareke I, *et al.* Reemergence of yellow fever in Ethiopia after 50 years, 2013: epidemiological and entomological investigations. *BMC Infect Dis.* 2017 May 15;17(1):343.

67. Hamlet A, Jean K, Perea W, Yactayo S, Biey J, Van Kerkhove M, *et al.* The seasonal influence of climate and environment on yellow fever transmission across Africa. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Mar 15;12(3):e0006284.

68. Fioravanti C. O combate à febre amarela no estado de São Paulo -- História, desafios e inovações. Secretaria de Estado da Saúde de São Paulo (SES-SP); 2018.

69. Litvoc MN, Novaes CTG, Lopes MIBF. Yellow fever. *Rev Assoc Med Bras.* 2018 Feb;64(2):106–13.

70. Mir D, Delatorre E, Bonaldo M, Lourenço-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.* 2017 Aug 7;7(1):7385.

71. Douam F, Ploss A. Yellow fever virus: knowledge gaps impeding the fight against an old foe. *Trends Microbiol.* 2018 Jun 19;26(11):913–28.

72. Rezende IM de, Sacchetto L, Munhoz de Mello É, Alves PA, Iani FC de M, Adelino TÉR, *et al.* Persistence of Yellow fever virus outside the Amazon Basin, causing epidemics in Southeast Brazil, from 2016 to 2018. *PLoS Negl Trop Dis.* 2018 Jun 4;12(6):e0006538.

73. Ferreira MS. Yellow Fever. *Ann Hepatol.* 2019;18(6):788–9.

74. Abreu FVS de, Delatorre E, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, de Castro MG, Ribeiro IP, *et al.* Combination of surveillance tools reveals that Yellow Fever virus can remain in the same Atlantic Forest area at least for three transmission seasons. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019 Apr 29;114:e190076.
75. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis. Plano de contingência para resposta às emergências em Saúde Pública: febre amarela [recurso eletrônico] [Internet]. Brasília: Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de Imunização e Doenças Transmissíveis.; 2021 [cited 2022 Mar 27]. Available from: http://bvsmms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/plano_contingencia_emergencias_febre_amarela_2_ed
76. de Thoisy B, Silva NIO, Sacchetto L, de Souza Trindade G, Drumond BP. Spatial epidemiology of yellow fever: Identification of determinants of the 2016-2018 epidemics and at-risk areas in Brazil. *PLoS Negl Trop Dis.* 2020 Oct 1;14(10): e0008691.
77. Delatorre E, de Abreu FVS, Ribeiro IP, Gómez MM, Dos Santos AAC, Ferreira-de-Brito A, *et al.* Distinct YFV Lineages Co-circulated in the Central-Western and Southeastern Brazilian Regions From 2015 to 2018. *Front Microbiol.* 2019 May 24; 10:1079.
78. de Oliveira Figueiredo P, Stoffella-Dutra AG, Barbosa Costa G, Silva de Oliveira J, Dourado Amaral C, Duarte Santos J, *et al.* Re-Emergence of Yellow Fever in Brazil during 2016-2019: Challenges, Lessons Learned, and perspectives. *Viruses.* 2020 Oct 30;12(11).
79. Fischer C, Torres MC, Patel P, Moreira-Soto A, Gould EA, Charrel RN, *et al.* Lineage-Specific Real-Time RT-PCR for Yellow Fever Virus Outbreak Surveillance, Brazil. *Emerging Infect Dis.* 2017 Nov 17;23(11).

80. Prist PR, Tambosi LR, Filipe Mucci L, Pinter A, Pereira de Souza R, Muylaert RL, *et al.* Roads and forest edges facilitate yellow fever virus dispersion. *J Appl Ecol.* 2021 Sep 18;
81. Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina. Boletim Epidemiológico nº 08/2021 Situação epidemiológica da Febre Amarela em Santa Catarina (Atualizado em 03/08/2021). Secretaria de Estado da Saúde de Santa Catarina; 2021 Aug.
82. Bonaldo MC, Gómez MM, Dos Santos AA, 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 Jun;112(6):447–51.
83. CENTRO DE VIGILÂNCIA EPIDEMIOLÓGICA “Prof. Alexandre Vranjac”. Secretaria Estadual de Saúde do Estado de São Paulo. BOLETIM EPIDEMIOLÓGICO DA FEBRE AMARELA – 18/11/2019 [Internet]. Secretaria Estadual de Saúde - SES/SP; 2019 Nov [cited 2022 Apr 2]. Available from: http://www.saude.sp.gov.br/resources/cve-centro-de-vigilancia-epidemiologica/areas-de-vigilancia/doencas-de-transmissao-por-vetores-e-zoonoses/doc/famarela/2019/fa19_boletim_epid_1811.pdf
84. Secretaria de Vigilância em Saúde. Monitoramento de Febre Amarela Brasil 2019. Brasil. Ministério da Saúde.; 2019 p. 1–8.
85. Ferreira MS. Yellow Fever. *Ann Hepatol.* 2019;18(6):788–9.
86. Barrett ADT. The reemergence of yellow fever. *Science.* 2018 Aug 31;361(6405):847–8.

-
87. Wilk-da-Silva R, Medeiros-Sousa AR, Laporta GZ, Mucci LF, Prist PR, Marrelli MT. The influence of landscape structure on the dispersal pattern of yellow fever virus in the state of São Paulo. *Acta Trop*. 2022 Jan 28; 228:106333.
88. Rosser JI, Nielsen-Saines K, Saad E, Fuller T. Reemergence of yellow fever virus in southeastern Brazil, 2017-2018: What sparked the spread? *PLoS Negl Trop Dis*. 2022 Feb 7;16(2):e0010133.
89. Ilacqua RC, Medeiros-Sousa AR, Ramos DG, Obara MT, Ceretti-Junior W, Mucci LF, *et al*. Reemergence of yellow fever in Brazil: the role of distinct landscape fragmentation thresholds. *J Environ Public Health*. 2021 Jul 23; 2021:8230789.
90. World Health Organization. WHO | Updates on yellow fever vaccination recommendations for international travelers related to the current situation in Brazil [Internet]. 2018 [cited 2020 Nov 7]. Available from: <http://www.who.int/ith/updates/20180116/en/>
91. Vannice K, Wilder-Smith A, Hombach J. Fractional-Dose Yellow Fever Vaccination - Advancing the Evidence Base. *N Engl J Med*. 2018 Aug 16;379(7):603–5.
92. Tonacio AC, do Nascimento Pedrosa T, Borba EF, Aikawa NE, Pasoto SG, Filho JCRF, *et al*. Immunogenicity and safety of primary fractional-dose yellow fever vaccine in autoimmune rheumatic diseases. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Nov 29;15(11):e0010002.
93. Rezende IM, Pereira LS, Fradico JRB, Pascoal Xavier MA, Alves PA, Campi-Azevedo AC, *et al*. Late-Relapsing Hepatitis after Yellow Fever. *Viruses*. 2020 Feb 17;12(2).

94. Osório FMF, Cañado GGL, Nardelli MJ, Vidigal PVT, Xavier MAP, Clemente WT. Hepatitis Relapse after Yellow Fever Infection: Is There Another Wave? *Rev Soc Bras Med Trop.* 2020 Jun 22;53: e20200152.
95. Trak-Smayra V, Kanaan C, Jaafar D, Nasnas R. Histopathology of the liver in yellow fever after two months of infection: A case report with literature review. *Virchows Arch.* 2016 Sep 26;469(S1):1–346.
96. Francis TI, Moore DL, Edington GM, Smith JA. A clinicopathological study of human yellow fever. *Bull World Health Organ.* 1972;46(5):659–67.
97. Denis B, Chirio D, Ponscarne D, Brichtler S, Colin de Verdière N, Simon F, *et al.* Hepatitis Rebound after Infection with Yellow Fever Virus. *Emerging Infect Dis.* 2019 Jun 17;25(6):1248–9.
98. Casadio LVB, Salles APM, Malta F de M, Leite GF, Ho Y-L, Gomes-Gouvêa MS, *et al.* Lipase and factor V (but not viral load) are prognostic factors for the evolution of severe yellow fever cases. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2019 May 20;114:e190033.
99. Casadio L, Nastri AC, Malta FM, Araujo J, Silva JB, Salomao J, *et al.* Late-Onset Relapsing Hepatitis Associated with Yellow Fever. *N Engl J Med.* 2020 May 21;382(21):2059–61.
100. Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo [Internet]. [cited 2022 Mar 31]. Available from: https://www.hc.fm.usp.br/index.php?option=com_content&view=featured&Itemid=101
101. Glikson M, Galun E, Oren R, Tur-Kaspa R, Shouval D. Relapsing hepatitis A. Review of 14 cases and literature survey. *Medicine (Baltimore).* 1992 Jan;71(1):14–23.

102. Figueiredo-Mello C, Casadio LVB, Avelino-Silva VI, Yeh-Li H, Sztajn bok J, Joelsons D, *et al.* Efficacy of sofosbuvir as treatment for yellow fever: protocol for a randomised controlled trial in Brazil (SOFFA study). *BMJ Open*. 2019 Nov 25;9(11): e027207.
103. Domingo C, Patel P, Yillah J, Weidmann M, Méndez JA, Nakouné ER, *et al.* Advanced yellow fever virus genome detection in point-of-care facilities and reference laboratories. *J Clin Microbiol*. 2012 Dec;50(12):4054–60.
104. Mantel N, Aguirre M, Gulia S, Girerd-Chambaz Y, Colombani S, Moste C, *et al.* Standardized quantitative RT-PCR assays for quantitation of yellow fever and chimeric yellow fever-dengue vaccines. *J Virol Methods*. 2008 Jul;151(1):40–6.
105. Nunes MRT, Palacios G, Cardoso JF, Martins LC, Sousa EC, de Lima CPS, *et al.* Genomic and phylogenetic characterization of Brazilian yellow fever virus strains. *J Virol*. 2012 Dec;86(24):13263–71.
106. Hall TA. BioEdit: a user-friendly biological sequence alignment editor and analysis program for Windows 95/98/NT. *Nucleic Acids Symposium Series*. 1999; 41:95–8.
107. Kumar S, Stecher G, Tamura K. MEGA7: molecular evolutionary genetics analysis version 7.0 for bigger datasets. *Mol Biol Evol*. 2016 Jul;33(7):1870–4.
108. Fernandes NCC de A, Cunha MS, Guerra JM, Réssio RA, Cirqueira CDS, Iglezias SD, *et al.* Outbreak of Yellow Fever among Nonhuman Primates, Espírito Santo, Brazil, 2017. *Emerging Infect Dis*. 2017;23(12):2038–41.
109. Gómez MM, Abreu FVS de, Santos AACD, Mello IS de, Santos MP, Ribeiro IP, *et al.* Genomic and structural features of the yellow fever virus from the 2016-2017 Brazilian outbreak. *J Gen Virol*. 2018 Apr;99(4):536–48.

110. Cunha MDP, Duarte-Neto AN, Pour SZ, Pereira BB de S, Ho Y-L, Perondi B, *et al.* Phylogeographic patterns of the yellow fever virus around the metropolitan region of São Paulo, Brazil, 2016-2019. *PLoS Negl Trop Dis.* 2022 Sep 23;16(9):e0010705.
111. Moreira Salles AP, de Seixas Santos NASTRI AC, Ho Y-L, Vilas Boas Casadio L, Emanuel Amgarten D, Justo Arévalo S, *et al.* Updating the Phylodynamics of Yellow Fever Virus 2016-2019 Brazilian Outbreak With New 2018 and 2019 São Paulo Genomes. *Front Microbiol.* 2022 Apr 14; 13:811318.
112. Staples JE, Monath TP. Yellow Fever. *Tropical infectious diseases: principles, pathogens and practice.* Elsevier; 2011. p. 492–503.
113. Arantes MF, Seabra VF, Lins PRG, Rodrigues CE, Reichert BV, Silveira MAD, *et al.* Risk factors for acute kidney injury and death in patients infected with the yellow fever virus during the 2018 outbreak in São Paulo, Brazil. *Kidney Int Rep.* 2022 Mar;7(3):601–9.
114. Li M, Wang B, Li L, Wong G, Liu Y, Ma J, *et al.* Rift valley fever virus and yellow fever virus in urine: A potential source of infection. *Viol Sin.* 2019 Jun;34(3):342–5.
115. Domingo C, Charrel RN, Schmidt-Chanasit J, Zeller H, Reusken C. Yellow fever in the diagnostics laboratory. *Emerg Microbes Infect.* 2018 Jul 12;7(1):129.
116. Forsmark CE, Vege SS, Wilcox CM. Acute Pancreatitis. *N Engl J Med.* 2016 Nov 17;375(20):1972–81.
117. Banks PA, Bollen TL, Dervenis C, Gooszen HG, Johnson CD, Sarr MG, *et al.* Classification of acute pancreatitis--2012: revision of the Atlanta classification and definitions by international consensus. *Gut.* 2013 Jan;62(1):102–11.

-
118. Garg PK, Singh VP. Organ failure due to systemic injury in acute pancreatitis. *Gastroenterology*. 2019 May;156(7):2008–23.
119. Lee PJ, Papachristou GI. New insights into acute pancreatitis. *Nat Rev Gastroenterol Hepatol*. 2019 Aug;16(8):479–96.
120. Ghweil AA, Osman HA, Khodeary A, Okasha A, Hassan MH. Relative frequency of acute pancreatitis from dengue outbreaks as a late complication, in Egypt. *Virusdisease*. 2019 Dec 11;30(4):498–503.
121. Buber J, Fink N, Bin H, Mouallem M. West Nile virus-induced pancreatitis. *Travel Med Infect Dis*. 2008 Nov;6(6):373–5.
122. Harrison AK, Murphy FA, Gardner JJ, Bauer SP. Myocardial and pancreatic necrosis induced by Rocio virus, a new flavivirus. *Exp Mol Pathol*. 1980 Feb;32(1):102–13.
123. Xiao SY, Zhang H, Guzman H, Tesh RB. Experimental yellow fever virus infection in the Golden hamster (*Mesocricetus auratus*). II. Pathology. *J Infect Dis*. 2001 May 15;183(10):1437–44.
124. Clinical practice guidelines panel, Wendon J, Panel members, Cordoba J, Dhawan A, Larsen FS, *et al*. EASL Clinical Practical Guidelines on the management of acute (fulminant) liver failure. *J Hepatol*. 2017;66(5):1047–81.
125. Dennis LH, Reisberg BE, Crosbie J, Crozier D, Conrad ME. The original haemorrhagic fever: yellow fever. *Br J Haematol*. 1969 Nov;17(5):455–62.
126. Giangrande PLF. Six characters in search of an author: the history of the nomenclature of coagulation factors. *Br J Haematol*. 2003 Jun;121(5):703–12.
127. Lam W, Moosavi L. Physiology, Factor V. *StatPearls*. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2020.

128. Izumi S, Langley PG, Wendon J, Ellis AJ, Pernambuco RB, Hughes RD, *et al.* Coagulation factor V levels as a prognostic indicator in fulminant hepatic failure. *Hepatology*. 1996 Jun;23(6):1507–11.
129. Bernuau J. High volume plasma exchange in patients with acute liver failure. *J Hepatol*. 2016 May 30;65(3):646–7.
130. Paessler S, Walker DH. Pathogenesis of the viral hemorrhagic fevers. *Annu Rev Pathol*. 2013 Jan 24; 8:411–40.
131. Correa R, Ortega-Loubon C, Zapata-Castro LE, Armién B, Culquichicón C. Dengue with Hemorrhagic Manifestations and Acute Pancreatitis: Case Report and Review. *Cureus*. 2019 Jun 13;11(6): e4895.
132. Dias LB, Alves VAF, Kanamura C, Oikawa RTC, Wakamatsu A. Fulminant hepatic failure in northern Brazil: morphological, immunohistochemical and pathogenic aspects of Lábrea hepatitis and yellow fever. *Trans R Soc Trop Med Hyg*. 2007 Aug;101(8):831–9.
133. de Oliveira RC, Fernandes J, Gonçalves-Oliveira J, Guterres A, de Lemos ERS. Out of the shadows, into the spotlight: Invisible zoonotic diseases in Brazil. *Lancet Reg Health Am*. 2022 Apr; 8:100202.
134. Romero A, Trejos A. Clínica y laboratorio de la Fiebre Amarilla en Costa Rica. *Revista de Biología Tropical*. 1954;
135. Trejos A, Romero A. Prothrombin levels in yellow fever. *Revista de Biología Tropical*. 1954;
136. de Pádua Afonso Borges A, de Oliveira GSC, de Almeida Netto JC. ESTUDO DA COAGULAÇÃO SANGUÍNEA NA FEBRE AMARELA. *Revista de Patologia Tropical / Journal of Tropical Pathology*. 1973;

-
137. Moriles KE, Azer SA. Alanine Amino Transferase. StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publishing; 2022.
138. Kim WR, Flamm SL, Di Bisceglie AM, Bodenheimer HC, Public Policy Committee of the American Association for the Study of Liver Disease. Serum activity of alanine aminotransferase (ALT) as an indicator of health and disease. *Hepatology*. 2008 Apr;47(4):1363–70.
139. De Ritis F, Coltorti M, Giusti G. An enzymic test for the diagnosis of viral hepatitis; the transaminase serum activities. *Clin Chim Acta*. 1957 Feb;2(1):70–4.
140. Botros M, Sikaris KA. The de ritis ratio: the test of time. *Clin Biochem Rev*. 2013 Nov;34(3):117–30.
141. Pranata R, Huang I, Lim MA, Yonas E, Vania R, Lukito AA, *et al*. Elevated De Ritis Ratio Is Associated With Poor Prognosis in COVID-19: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Front Med (Lausanne)*. 2021 Dec 22; 8:676581.
142. Qin C, Wei Y, Lyu X, Zhao B, Feng Y, Li T, *et al*. High aspartate aminotransferase to alanine aminotransferase ratio on admission as risk factor for poor prognosis in COVID-19 patients. *Sci Rep*. 2020 Oct 5;10(1):16496.
143. Klotz O, Belt TH. Regeneration of liver and kidney following yellow fever. *Am J Pathol*. 1930 Nov;6(6):689–97.
144. Jones EM, Wilson DC. Clinical features of yellow fever cases at Vom Christian Hospital during the 1969 epidemic on the Jos Plateau, Nigeria. *Bull World Health Organ*. 1972;46(5):653–7.
145. Sacchetto L, Drumond BP, Han BA, Nogueira ML, Vasilakis N. Re-emergence of yellow fever in the neotropics - quo vadis? *Emerg Top Life Sci*. 2020 Dec 11;4(4):399–410.

146. Lopes RL, Pinto JR, Silva Junior GB da, Santos AKT, Souza MTO, Daher EDF. Kidney involvement in yellow fever: a review. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 2019 Jul 22;61: e35.
147. Burdmann EA. Flaviviruses and kidney diseases. *Adv Chronic Kidney Dis*. 2019 May;26(3):198–206.
148. De Brito T, Siqueira SA, Santos RT, Nassar ES, Coimbra TL, Alves VA. Human fatal yellow fever. Immunohistochemical detection of viral antigens in the liver, kidney and heart. *Pathol Res Pract*. 1992 Feb;188(1–2):177–81.
149. Oudart JL, Rey M. [Proteinuria, proteinaemia, and serum transaminase activity in 23 confirmed cases of yellow fever]. *Bull World Health Organ*. 1970;42(1):95–102.
150. Ferreira MS, Júnior PSB, Cerqueira VD, Rivero GRC, Júnior CAO, Castro PHG, *et al*. Experimental yellow fever virus infection in the squirrel monkey (*Saimiri spp.*) I: gross anatomical and histopathological findings in organs at necropsy. *Mem Inst Oswaldo Cruz*. 2020 Nov 9;115:e190501.
151. Nassar E da S, Chamelet EL, Coimbra TL, de Souza LT, Suzuki A, Ferreira IB, *et al*. Jungle yellow fever: clinical and laboratorial studies emphasizing viremia on a human case. *Rev Inst Med Trop Sao Paulo*. 1995 Aug;37(4):337–41.
152. Neves YCS, Castro-Lima VAC de, Solla DJF, Ogata VS de M, Pereira FL, Araujo JM, *et al*. Staging liver fibrosis after severe yellow fever with ultrasound elastography in Brazil: A six-month follow-up study. *PLoS Negl Trop Dis*. 2021 Jul 20;15(7):e0009594.
153. Neves YCS, Castro-Lima VAC, Solla DJF, Ogata VSM, Pereira FL, Araujo JM, *et al*. Ultrasound findings and laboratory predictors of early mortality in patients with severe yellow fever. *AJR Am J Roentgenol*. 2021 Mar 11;1–8.

-
154. Vasconcelos PF da C. [Yellow Fever]. *Rev Soc Bras Med Trop*. 2003 Apr;36(2):275–93.
155. Quaresma JAS, Duarte MIS, Vasconcelos PFC. Midzonal lesions in yellow fever: a specific pattern of liver injury caused by direct virus action and in situ inflammatory response. *Med Hypotheses*. 2006 May 2;67(3):618–21.
156. Quaresma JAS, Barros VLRS, Fernandes ER, Pagliari C, Guedes F, da Costa Vasconcelos PF, *et al*. Immunohistochemical examination of the role of Fas ligand and lymphocytes in the pathogenesis of human liver yellow fever. *Virus Res*. 2006 Mar;116(1–2):91–7.
157. Ahmed F, Ibrahim A, Cooper CL, Kumar A, Crawley AM. Chronic Hepatitis C Virus Infection Impairs M1 Macrophage Differentiation and Contributes to CD8+ T-Cell Dysfunction. *Cells*. 2019 Apr 25;8(4).
158. Xiao S-Y, Guzman H, da Rosa APAT, Zhu H-B, Tesh RB. Alteration of clinical outcome and histopathology of yellow fever virus infection in a hamster model by previous infection with heterologous flaviviruses. *Am J Trop Med Hyg*. 2003 Jun;68(6):695–703.
159. Zhao B, Zhang H-Y, Xie G-J, Liu H-M, Chen Q, Li R-F, *et al*. Evaluation of the efficacy of steroid therapy on acute liver failure. *Exp Ther Med*. 2016 Nov;12(5):3121–9.
160. Potthoff A, Deterding K, Trautwein C, Flemming P, Strassburg CP, Manns MP, *et al*. Steroid treatment for severe acute cryptogenic hepatitis. *Z Gastroenterol*. 2007 Jan;45(1):15–9.

8. ANEXOS

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE)

HOSPITAL DAS CLÍNICAS DA FACULDADE DE MEDICINA DA UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO-HCFMUSP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

DADOS SOBRE A PESQUISA

TÍTULO DA PESQUISA: Caracterização das Hepatites Agudas em centros de referência da cidade de São Paulo

PESQUISADOR PRINCIPAL: Michele Soares Gomes Gouvêa

DEPARTAMENTO/INSTITUTO: Gastroenterologia/Instituto de Medicina Tropical da USP

Convidamos você para participar da pesquisa: "Caracterização das Hepatites Agudas em centros de referência da cidade de São Paulo".

A hepatite é uma inflamação do fígado que pode ser provocada por diversas causas incluindo vírus, medicamentos, doenças autoimunes, dentre outras. As hepatites agudas de causa viral e medicamentosa são as mais frequentes. Dentre os vírus causadores de hepatite destacam-se aqueles que tem preferência pela infecção das células do fígado que são: vírus da hepatite A (HAV), vírus da hepatite B (HBV), vírus da hepatite C (HCV), vírus da hepatite Delta (HDV) e vírus da hepatite E (HEV).

Esta pesquisa tem por objetivo o mapeamento das causas de hepatite aguda entre os pacientes atendidos com esse quadro clínico em centros de referência da cidade de São Paulo. Além disso, nos casos de hepatite aguda causada por algum dos vírus citados acima o genoma do vírus detectado será analisado. Os resultados dessa análise nos permitirão sugerir a origem do vírus e nos ajudarão a entender como esses vírus estão se espalhando em nosso meio, o que nos ajudará a propor estratégias mais eficientes para combater o espalhamento dessas infecções. Em alguns pacientes a causa da hepatite aguda não é identificada ou é associada a uso de algum medicamento específico, nesses casos iremos aplicar métodos modernos de biologia molecular (estudo do viroma por sequenciamento de nova geração) que permitem a identificação de todos os possíveis vírus existentes na amostra analisada e dessa forma será possível associar ou descartar a participação de algum vírus no processo de inflamação aguda do fígado.

Pretendemos também identificar características genéticas e imunológicas individuais para avaliar possíveis associações com a evolução do quadro clínico.

Procedimentos que serão realizados e métodos que serão empregados: se você aceitar participar deste estudo, além dos exames de rotina comumente realizados para diagnóstico na instituição que você está sendo atendido, serão coletados 3 tubos de sangue (1 seco e 2 com EDTA) contendo cerca de 4 ml de sangue cada um e uma amostra de fezes (5 ml ou 5 gramas). A coleta de sangue será

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável_____

Rubrica do pesquisador_____

realizada por punção periférica da veia do antebraço e a coleta de fezes será realizada por você mesmo em frasco coletor de boca larga e tampa rosqueável.

Explicitação de possíveis desconfortos e riscos decorrentes da participação na pesquisa: a coleta de sangue não envolve risco importante para a sua saúde, no entanto, pode ocasionar desconforto em função da picada da agulha, que é levemente dolorosa. Também pode ocorrer discreto hematoma por extravasamento de sangue sob a pele; caso isto venha a ocorrer, esse problema desaparece em poucos dias sem nenhum cuidado especial.

Benefícios esperados para o participante: o benefício direto para você será a possibilidade de ter um diagnóstico diferencial que envolve a realização de exames que não são realizados na rotina pela instituição em que você está sendo atendido, como o exames para diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite E ou pelo vírus da hepatite Delta (nos casos com infecção pelo vírus da hepatite B). Se o seu caso for um daqueles em que não é possível identificar a causa da hepatite com os exames disponíveis para isso, você poderá contribuir para esclarecermos se há outros vírus, além dos conhecidos, envolvidos na causa de hepatites agudas.

No caso de cronificação de infecção por vírus das hepatites B ou C os exames de caracterização dos genes dos vírus permitirão a escolha de tratamento mais adequado, o que não é realizado rotineiramente na instituição em que você está sendo atendido.

Esclarecimento sobre a forma de acompanhamento e assistência a que terão direito os participantes da pesquisa: em qualquer etapa do estudo, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. A principal investigadora é o Dra. MICHELE SOARES GOMES GOUVÊA, que pode ser encontrada no endereço Av. Dr. Enéas Carvalho de Aguiar n° 500 prédio 2, 2° andar Telefone(s) (11) 3061-8218. Se você tiver alguma consideração ou dúvida sobre a ética da pesquisa, entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) – Rua Ovídio Pires de Campos, 225 – 5° andar – tel: (11) 2661-7585, (11) 2661-1548, (11) 2661-1549; e-mail: cappelq.adm@hc.fm.usp.br. Você receberá uma via deste documento para poder consultar posteriormente as informações sobre o projeto e o telefone para contato.

É garantida a liberdade da retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade de seu tratamento na Instituição.

Direito de confidencialidade: as informações obtidas serão analisadas em conjunto com outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente.

Direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais das pesquisas: você tem direito de ser mantido atualizado sobre os resultados parciais deste estudo assim que os pesquisadores tiverem conhecimento desses resultados.

Despesas e compensações: não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação.

Destino do material coletado: após as análises propostas nesta pesquisa as amostras coletadas poderão ser armazenadas para possíveis pesquisas futuras. Se você autorizar esse armazenamento o material coletado será armazenado no laboratório de Gastroenterologia e Hepatologia Tropical – FMUSP sob responsabilidade da Dra. Michele Soares Gomes Gouvêa e caso seja útil para pesquisas futuras as amostras somente serão utilizadas após aprovação do novo projeto pelo comitê de ética e de forma anônima. Ressaltamos que o não consentimento para o armazenamento desse material não implica em exclusão do voluntário do estudo.

Autorizo o uso do material armazenado para o desenvolvimento de projetos futuros desde que seja feito de maneira anônima.

() SIM

() NÃO

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo "Caracterização das Hepatites Agudas em centros de referência da cidade de São Paulo". Eu discuti com o (a) Dr(a). _____ sobre a minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e estou ciente que poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

Assinatura do paciente/representante legal Data ____ / ____ / ____

Assinatura da testemunha Data ____ / ____ / ____

para casos de pacientes menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual.

(Somente para o responsável do projeto)

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

Rubrica do sujeito de pesquisa ou responsável _____

Rubrica do pesquisador _____

Assinatura do responsável pelo estudo Data ____ / ____ / ____

DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL

1. NOME:
DOCUMENTO DE IDENTIDADE Nº: SEXO: .M F
DATA NASCIMENTO:/...../.....
ENDEREÇO Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE
CEP:..... TELEFONE: DDD (.....)

2. RESPONSÁVEL LEGAL
NATUREZA (grau de parentesco, tutor, curador etc.)
DOCUMENTO DE IDENTIDADE :SEXO: M F
DATA NASCIMENTO.:/...../.....
ENDEREÇO: Nº APTO:
BAIRRO: CIDADE:
CEP: TELEFONE: DDD (.....)

ANEXO B – Parecer Consubstanciado do CEP



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Caracterização das Hepatites Agudas em centros de referência da cidade de São Paulo

Pesquisador: Michele Soares Gomes Gouvêa

Área Temática: Genética Humana:

(Trata-se de pesquisa envolvendo Genética Humana que não necessita de análise ética por parte da CONEP.);

Versão: 4

CAAE: 74535417.3.1001.0068

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

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.046.518

Apresentação do Projeto:

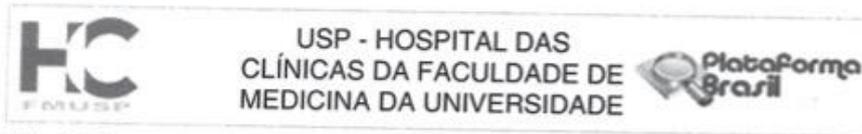
Durante o primeiro atendimento serão colhidos, em questionário específico (Anexo 2), dados demográficos, epidemiológicos e clínicos. Será colhida amostra de sangue para análise laboratorial, incluindo sorologias para HEV e HDV, detecção, quantificação

e caracterização (genotipagem) dos respectivos genomas virais nos casos com evidência sorológica de infecção por de HAV, HBV, HCV, HDV ou HEV. Nessa amostra será também realizada a pesquisa de marcadores genéticos e imunológicos dos pacientes para estudo de associação com a evolução clínica da infecção viral e também para avaliação de fatores de risco genéticos associados a DILI. Será também colhida amostra de fezes

para pesquisa de HAV e HEV por PCR (reação em cadeia da polimerase). As amostras de plasma e fezes também serão utilizadas para realização de estudo da metagenômica viral nos casos definidos como hepatite aguda de etiologia criptogênica ou com suspeita de DILI. Após a coleta as amostras serão adequadamente processadas e armazenadas e posteriormente encaminhadas para o Laboratório de Gastroenterologia e

Hepatologia Tropical para análise. Haverá um seguimento agendado com os pacientes para conhecimento dos resultados dos exames laboratoriais, definir o desfecho do quadro agudo e conclusão do preenchimento da ficha de dados. O prontuário dos pacientes será consultado para

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



Continuação do Parecer: 3.046.518

obtenção dos resultados referentes à investigação da etiologia do quadro de hepatite aguda, resultados bioquímicos e dados clínicos relacionados à evolução do quadro. Os dados demográficos, epidemiológicos, clínicos e laboratoriais serão analisados estatisticamente. Procedimentos laboratoriais. O diagnóstico sorológico para identificação de infecção pelos vírus das hepatites será realizado pela metodologia de ELISA utilizando kits disponíveis comercialmente. Em cada uma das instituições onde os pacientes serão atendidos o diagnóstico seguirá o fluxograma estabelecido pela Secretaria da Saúde do estado de São Paulo, que prevê a pesquisa de marcadores de infecção pelo HAV, HBV e HCV.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário: Caracterizar a etiologia dos casos de hepatites agudas atendidos em instituições de referência na cidade de São Paulo. **Objetivo Secundário:** Avaliar as formas de transmissão dos diferentes agentes etiológicos infecciosos envolvidos;

- Caracterizar os genótipos dos vírus hepatotrópicos identificados nos casos de hepatite aguda por esses agentes;
- Entre os casos suspeitos de DILI e aqueles sem etiologia definida, avaliar o envolvimento de outros agentes virais ou infecção oculta por vírus hepatotrópicos através da análise de metagenômica viral utilizando sequenciamento de nova geração;
- Descrever os principais agentes (fármacos, xenobióticos, ervas medicinais, suplementos dietéticos) e avaliar os fatores de risco genéticos e não genéticos envolvidos nos casos de lesão hepática aguda induzida por drogas;
- Analisar as possíveis associações dos diferentes desfechos clínicos a variáveis demográficas, etiológicas, genéticas e imunológicas;
- Comparar a etiologia e os diferentes desfechos clínicos observados entre pacientes coinfectados ou não pelo HIV;

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: O desenvolvimento deste projeto não oferece riscos para os participantes. Para os profissionais envolvidos no desenvolvimento do projeto os riscos são aqueles inerentes às suas atividades de rotina, sejam elas clínicas no atendimento dos pacientes, sejam elas laboratoriais na análise das amostras para diagnóstico. Para eliminar ou minimizar esses riscos as regras de biossegurança serão estritamente seguidas. **Benefícios:** Com este projeto esperamos contribuir para gerar conhecimento mais detalhado acerca da etiologia das hepatites agudas atendidas em instituições de referência na cidade de São Paulo. Nos casos de etiologia por vírus hepatotrópicos a caracterização dos genótipos virais envolvidos e as análises filogenéticas poderão contribuir para inferências sobre origem da cepa viral, o que será de grande utilidade para que possamos ter uma visão mais concreta acerca da disseminação desses vírus na cidade de São Paulo, e para promoção de melhorias nas estratégias de prevenção e controles dessas infecções. Além disso, o estudo da

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



Continuação do Parecer: 3.046.518

metagenômica viral contribuirá para que possamos ter um diagnóstico mais preciso nos casos de hepatite aguda criptogênica e também nos casos suspeitos de lesão hepática causada por drogas (DILI - do inglês: "Drug Induced Liver Disease"). Para os pacientes participantes da pesquisa o benefício direto será a possibilidade de ter um diagnóstico diferencial que envolve a realização de exames que não são realizados rotineiramente pelas instituições envolvidas, como os exames para diagnóstico de infecção pelo vírus da hepatite E ou pelo vírus da hepatite Delta. No caso de cronificação de infecção por vírus das hepatites B ou C os exames de caracterização dos genes dos vírus permitirão a escolha de tratamento mais adequado, o que também não é realizado rotineiramente nas instituições envolvidas.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se da solicitação de inclusão e um pesquisador, bem como um braço para o projeto original, conforme descrito nas conclusões.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão bem descritos e de maneira clara.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Ciente e de acordo com a emenda solicitando a inclusão de um braço da pesquisa que terá como executante a aluna Luciana Vilas Boas Casadio, que desenvolverá esse braço da pesquisa como projeto de pós graduação (Doutorado Direto) no programa de Ciências em Gastroenterologia do departamento de Gastroenterologia da FMUSP sob orientação do Dr. João Renato Rebello Pinho e coorientação da Dra. Ana Catharina Seixas Santos Nastri. O título proposto para esse projeto é: "Associação entre viremia e desfechos clínicos dos pacientes com febre amarela internados nas Unidades de terapia intensiva do HCFMUSP". De acordo também com a inclusão da referida aluna na equipe de pesquisa.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1253970_E3.pdf	08/11/2018 08:53:11		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



Continuação do Parecer: 3.046.518

Outros	Projeto_de_Doutorado_Luciana_Vilas_B oas.docx	08/11/2018 08:50:39	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Outros	CartaemendaNov2018.pdf	08/11/2018 08:50:11	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Outros	Carta_emenda_CAAE_74535417_3_00 00_0068.pdf	10/10/2017 15:24:08	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Outros	Cadastronline_Michele.PDF	25/08/2017 03:26:28	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_plataformaBrasilassinad a_Michele.PDF	25/08/2017 03:25:41	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Outros	Carta_de_anuencia_Dr_Joao_Renato_I MT.pdf	17/08/2017 15:38:40	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Outros	Termo_de_Anuencia_Dra_Cassia_Mend es_Dep_MI.pdf	17/08/2017 15:38:12	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Outros	Questionario_hepatites_Agudas.pdf	17/08/2017 15:37:22	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Anexo_1_TCLE_Hepatites_Agudas_FIN AL.comcorrecoes.pdf	17/08/2017 15:36:58	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Hepatites_Agudas_v20170714. pdf	17/08/2017 15:36:21	Michele Soares Gomes Gouvêa	Aceito

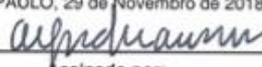
Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 29 de Novembro de 2018


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

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

ANEXO C - Biópsias hepáticas de hepatite tardia associada a febre amarela

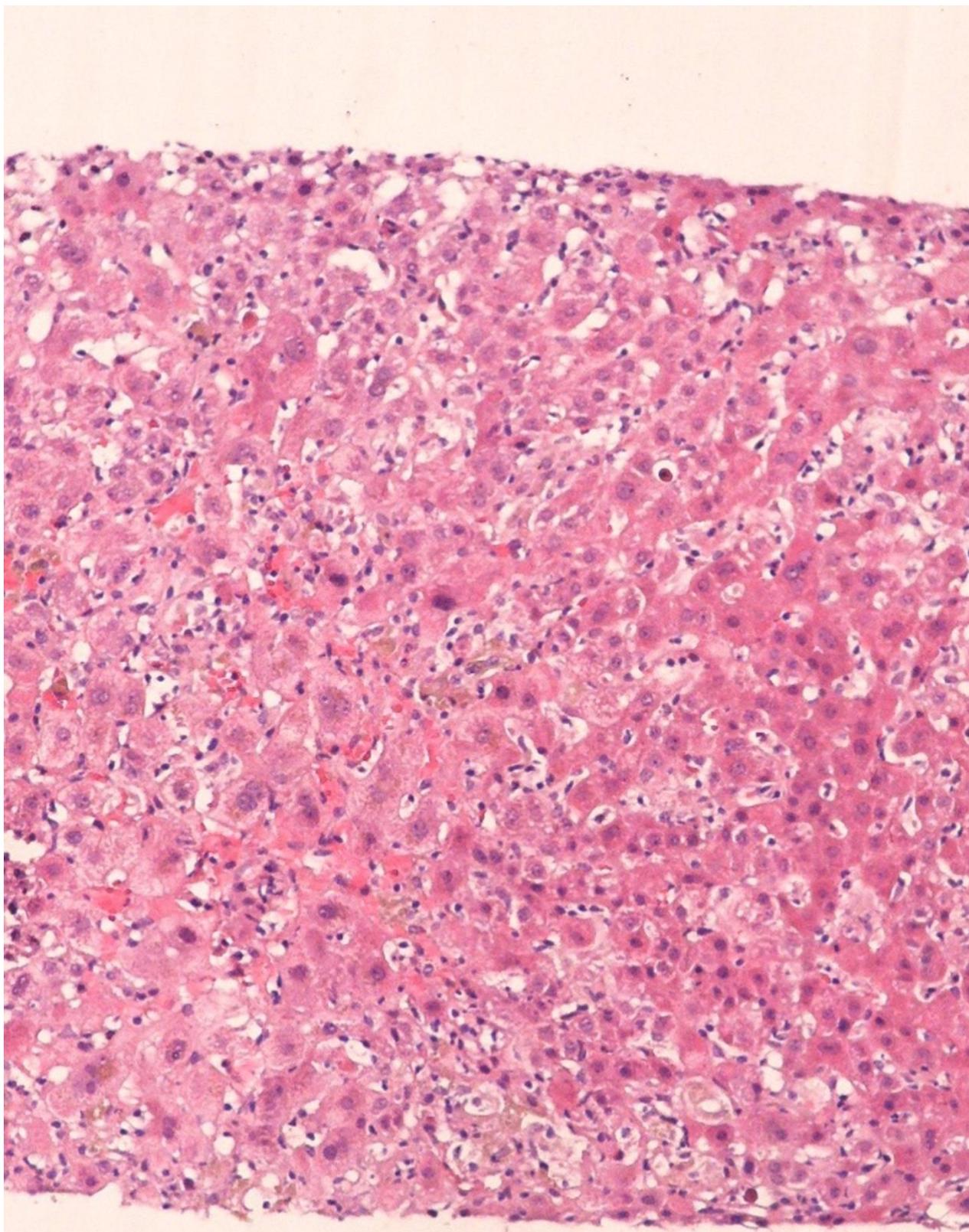


Figura 14. A. Padrão típico de “hepatite lobular” com apoptose e necrose focal de hepatócitos. As células de Kupffer são hipertróficas.

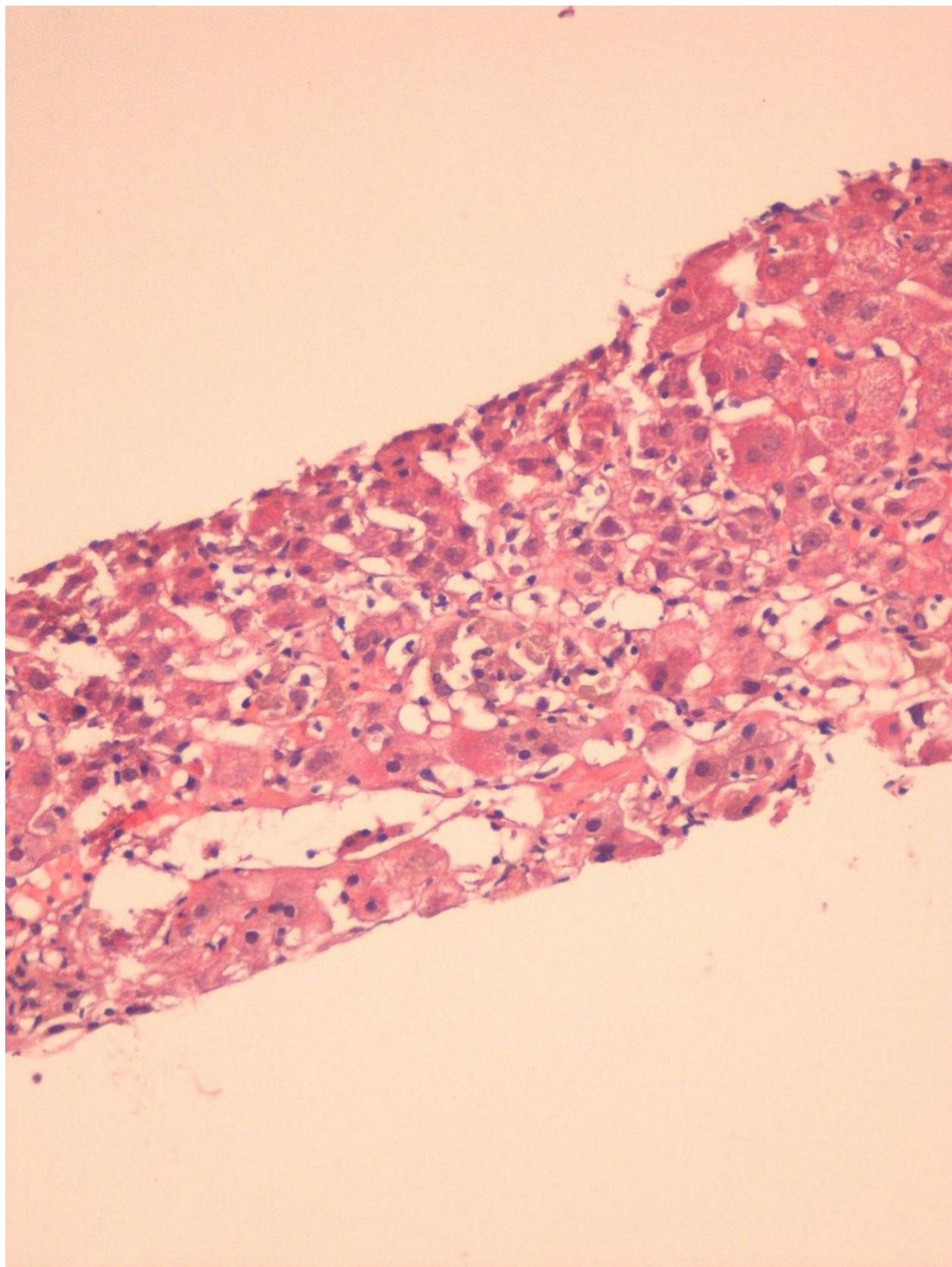


Figura 14. B. Necrose confluyente permeada por leucócitos diversos, mono e polimorfonucleares. As células de Kupffer hipertróficas são visualizadas em sinusóides dilatados

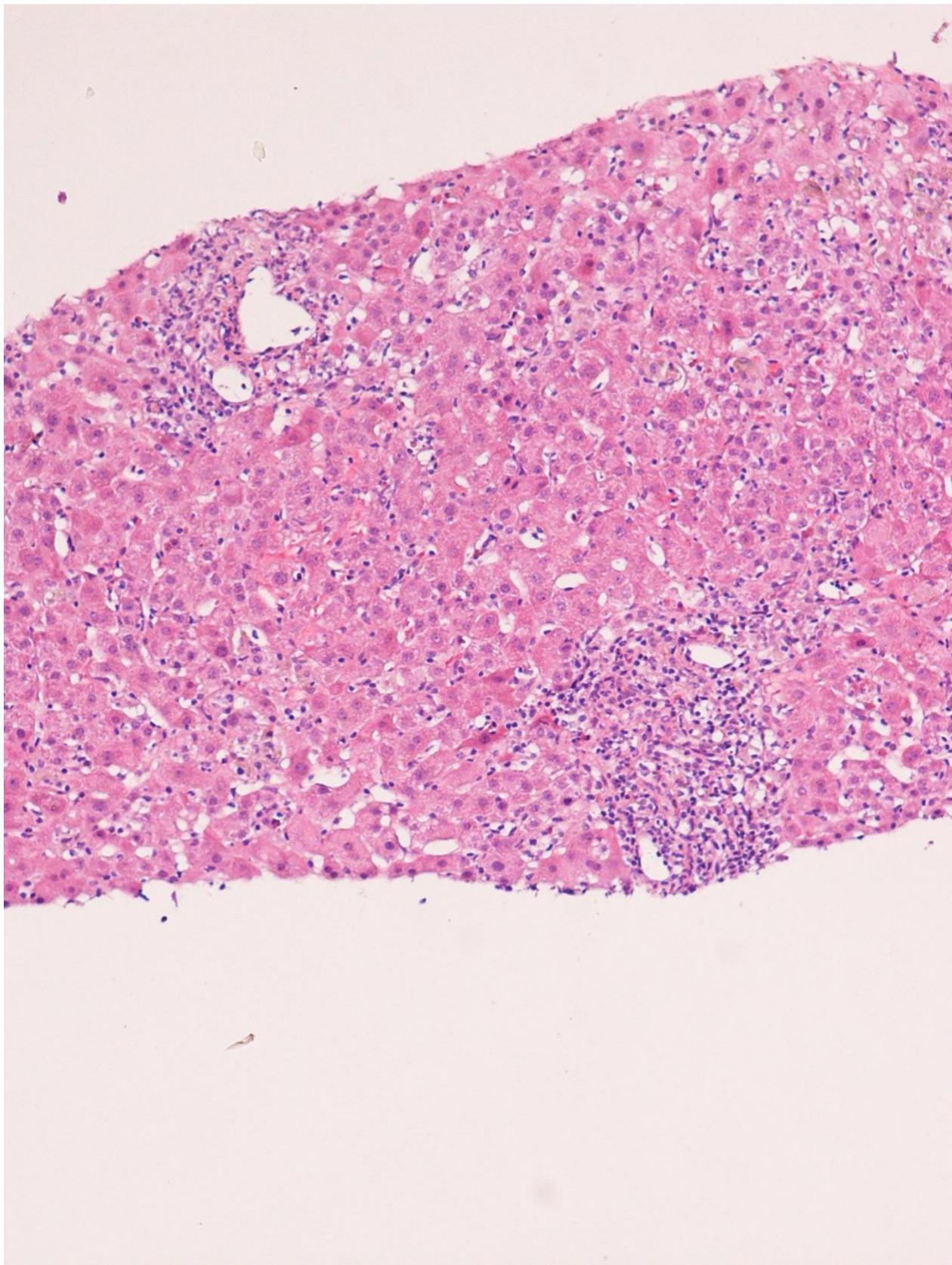


Figura 14. C. Edema portal moderado e infiltrado inflamatório misto apresentam focos de transbordamento;

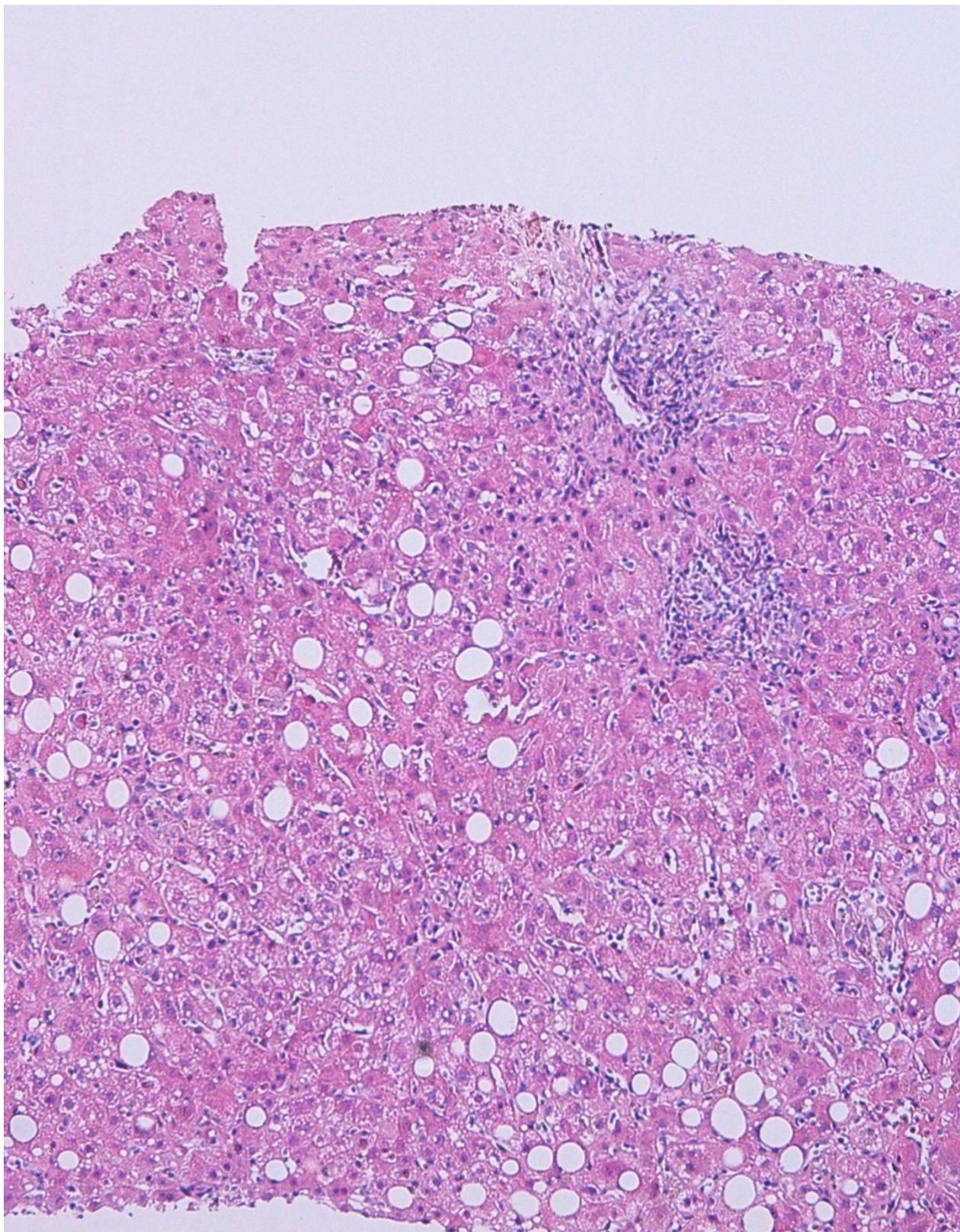


Figura 14. D. Esteatose macrovesicular, não remanescente de febre amarela aguda, foi encontrada em apenas um caso, com inflamação lobular e portal mínima

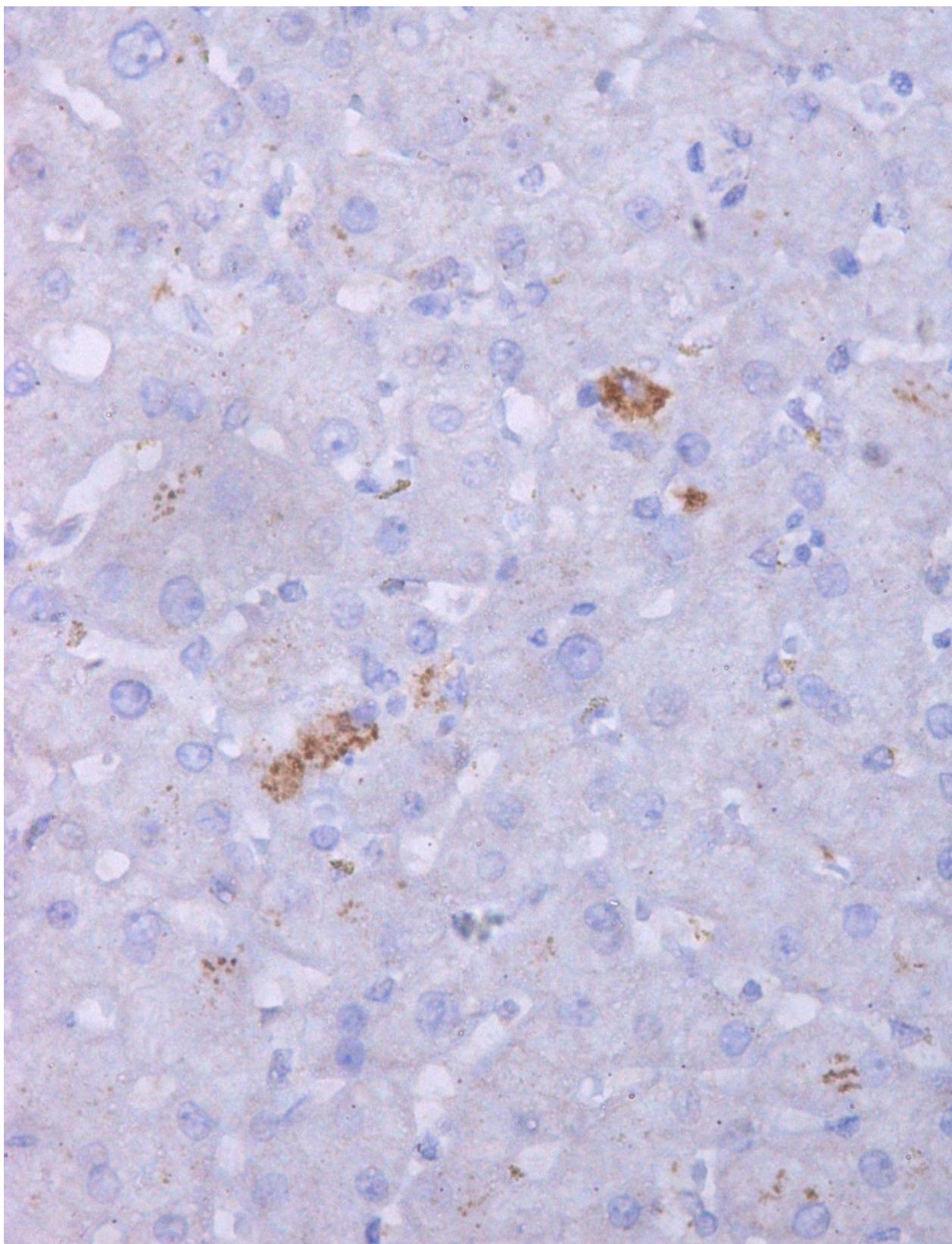


Figura 14. E. Detecção imunohistoquímica do antígeno da febre amarela (FA-Ag) quase restrita ao citoplasma das células de Kupffer hipertróficas nesta área de inflamação lobular mínima.

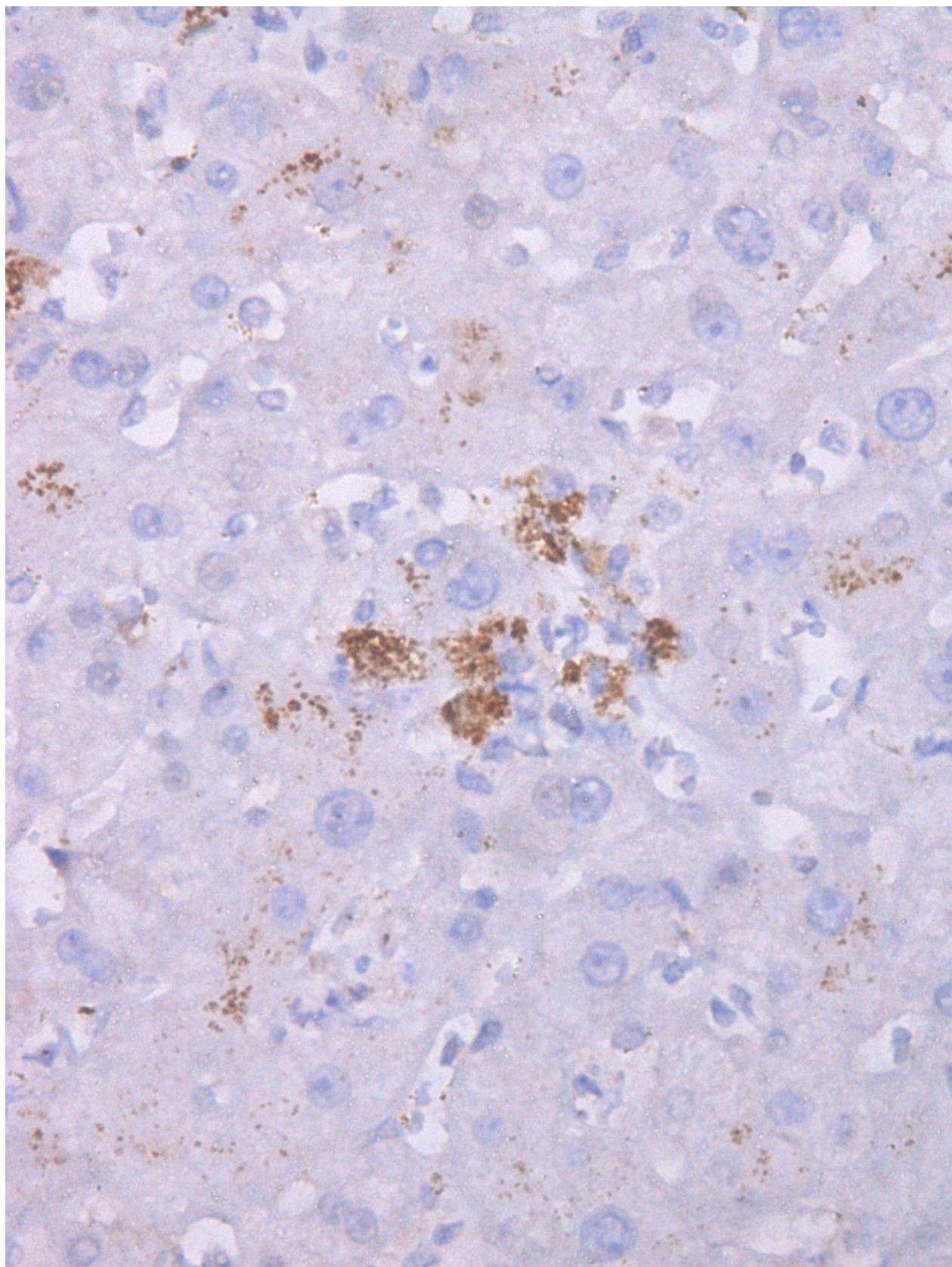


Figura 14. F. FA-Ag imuno-corado mais intensamente em um agregado de macrófagos em um lóbulo hepático moderadamente inflamado.